FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1961 - N° 13

TITRE DE LA THESE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HYDROXYLATION DES FLAVONES

THESE

présentée

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 30 Octobre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (d'Etat)

par

WINICKI Bernard
Né le 9 Mai 1934
à MULHOUSE (Haut-Rhin)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1961 - N° 13

TITRE DE LA THESE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HYDROXYLATION DES FLAVONES

THESE

présentée

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 30 Octobre 1961
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (d'Etat)

par

WINICKI Bernard

Né le 9 Mai 1934
à MULHOUSE (Haut-Rhin)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE
LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

M. M. LEVRAT : Assesseur

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND , MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

MM. HERMANN	*Physiologie*
CIBERT	*Clinique Urologique*
PONTHUS (Détaché à Beyrouth)	*Physique Biologique*
DECHAUME	*Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale*
ROCHET	*Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire*
CHAMBON	*Chimie Organique et Toxicologie*
WERTHEIMER	*Clinique Chirurgicale B*
PAUPERT-RAVAULT	*Clinique Médicale B*
FROMENT	*Clinique et Prophylaxie Cardio-Vasculaires*
CROIZAT	*Clinique Médicale C*
ENSELME	*Chimie Biologique et Médicale*
MALLET-GUY	*Clinique Chirurgicale A*
GUILLEMINET	*Clinique Orthopédique et de Chirurgie Infantile*
REVOL	*Pharmacie Galénique et Matière Médicale*
POLLOSSON	*Clinique Gynécologique*
PIGEAUD	*Clinique Obstétricale*
BOURRET	*Médecine du Travail*
LEVRAT	*Clinique Médicale A*
SOHIER	*Hygiène et Action sanitaire et sociale*
DUCLOS	*Clinique Stomatologique*
BERNHEIM	*Clinique Médiacle infantile et Hygiène du premier âge*
JOURDAN	*Biologie Médicale et Pharmacodynamie*
NETIEN	*Botanique et Cryptogamie*
BERTRAND	*Clinique Chirurgicale C*
BADINAND	*Chimie Analytique Pharmaceutique*
DREVON	*Pharmacie chimique et Pharmacologie*
ROCHE	*Médecine Légale et Déontologie*
COUDERT	*Parasitologie et Pathologie Exotique*
MOUNIER-KUHN	*Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'Audio-Phonologie*
PAUFIQUE	*Clinique Ophtalmologique*
THIERS	*Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie*
BRUN	*Clinique de Pneumo- Phtisiologie*
CREYSSEL Jean	*Clinique Traumatologique des Membres*
DARGENT	*Cancérologie*
GUICHARD	*Anatomie Pathologique*
GIRARD Paul	*Pathologie générale et Expérimentale*
LATARJET	*Anatomie*
PEYCELON	*Pathologie Chirurgicale*
GIRARD Marcel	*Thérapeutique*
VACHON	*Pathologie Médicale*
GALY	*Physio-Pathologie des Voies respiratoires*
KEHL	*Histologie*
PAPILLON	*Radiologie*
JEUNE	*Clinique des Maladies Infectieuses*
GONIN	*Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale*
MONNET	*Bactériologie*

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	*Physique nucléaire appliquée à la Médecine*
DORCHE	*Technologie Pharmaceutique*

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. BANSSILLON	Obstétrique	CHATONNET	Physiologie
ROMAN	Parasitologie	CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
BERTOYE	Bactériologie		
CIER J. François	Physiologie	PERROT	Chimie organique & Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

MM. FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique
CREYSSEL Roger	Chimie biologique et Médicale
DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN Jean-Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique
ODDOUX Lucien	Botanique et Cryptogamie

AGREGES EN EXERCICE

MM. LECUIRE Jean	Chargé d'enseignement	Neuro-Chirurgie
MATHIEU Jacques		Obstétrique
MARION Joseph		Orthopédie
PONT Maurice	Chargé d'enseignement	Propédeutique Médicale
VIGNON Georges	«	Pathologie Médicale
REVOL Louis	«	Pathologie Médicale
JAUBERT de BEAUJEU	«	Pathologie Chirurgicale
GUILLEMIN Georges	«	Propédeutique Chirurgicale
BURTHIAULT René	«	Obstétrique
FRANCOIS René	«	Pédiatrie, Puériculture
GUINET Paul		Médecine Générale
SAUTOT Jean		Pathologie Chirurgicale
MARION Pierre		Chirurgie Générale
MICHAUD Pierre		Chirurgie Générale
GIGNOUX Marcel		Oto-Rhino-Laryngologie
FREIDEL Charles		Stomatologie
PLAUCHU Marcel		Médecine Générale
TRAEGER Jules		Médecine Générale
DEVIC Michel	Chargé d'enseignement	Pathologie Médicale
COLIN Marcel	«	Médecine Légale
GUYOTAT Jean	«	Neurologie
DUMONT Martial	«	Obstétrique
DURAND Louis	«	Urologie
de MOURGUES Georges	«	Chirurgie Générale
DESPIERRES Charles	«	Médecine Générale
FRANCILLON Jacques		Chirurgie Générale
TOLOT François		Médecine du Travail
SAUBIER Eugène		Chirurgie Générale
COLOMB Daniel		Dermatologie
SCHOTT Bernard		Neurologie, Psychiatrie
BONAMOUR Georges		Ophtalmologie

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. B. DREVON
L. REVOL
A. BADINAND
A. CIER
J. CHOPIN

A MA FEMME

avec tout mon Amour

A MES PARENTS

Je ne saurai leur exprimer tout ce que je leur dois.

A MES FRERES

A MES BEAUX-PARENTS

en affectueux hommage

A NOS FAMILLES

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur B.DREVON

Nous avons bénéficié, durant toutes nos études, de la richesse de son enseignement. Il nous a fait le très grand honneur d'accepter la Présidence de notre Jury.
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos remerciements respectueux.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur L. REVOL

Nous avons été très sensibles à la chaleur de son accueil, à sa bienveillance et à l'intérêt qu'il nous a toujours manifesté. Nous le remercions très vivement d'avoir consenti à juger ce travail.

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Il nous a appris à travailler. Il est pour nous un conseiller, respecté, écouté. Nous nous sommes efforcés dans ce travail de nous montrer dignes de ce qu'il nous a enseigné.

Monsieur le Professeur J. CHOPIN

Ses conseils, son aide, son optimisme ont été les atouts inappréciables qui nous ont permis de mener à bien la réalisation de ce travail.
Nous ne saurions assez lui témoigner toute notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. CIER

Il nous a accueilli dans son laboratoire, il nous a confié ce travail, il en a suivi pas à pas le lent déroulement. Il ne nous a ménagé ni sa peine, ni son temps. En nous permettant de présenter aujourd'hui ce travail sous forme de thèse, il nous prouve sa confiance.
Nous ne saurions assez lui exprimer toute notre gratitude et notre attachement.

A Monsieur le Professeur A. BOUCHERLE

Son enthousiasme, sa simplicité, sa gentillesse, ses connaissances, sont pour nous autant d'exemples que nous aimerions pouvoir suivre.

A Monsieur le Professeur Agrégé R. MALLEIN

Sa personnalité a fortement marqué notre internat. Il nous a toujours donné son appui. Nous l'assurons ici de notre amicale fidélité.

A Monsieur le Pharmacien Capitaine C. NOFRE.

L'étendue de ses connaissances nous a étonnés. Nous en avons très souvent profité. Qu'il soit ici amicalement assuré de notre reconnaissance.

A nos camarades de l'Internat en Pharmacie de Lyon.
A nos camarades du Laboratoire.

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre amicale sympathie.

A nos Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

SOMMAIRE

page

INTRODUCTION 7

I. HYDROXYLATION DIRECTE DES STRUCTURES FLAVONIQUES. ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES 9

I.I. Utilisation du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin 10

I.I.I. Etude des flavanones et des hydroxy-2 chalcones

I.I.2. " " aurones

I.I.3. " " flavones

I.2. Utilisation du réactif de Fenton 13

I.3. " " tétracétate de plomb 13

I.4. " " réactif d'Elbs 14

I.5. Intérêt biogénétique de ces résultats 15

I.5.I. Hydroxylation du noyau A

I.5.2. " " " B

TRAVAIL PERSONNEL

2. Première Partie - FORMATION D'HYDROXYFLAVONES PAR PROCESSUS RADICALIQUE

2.I. Introduction 23

2.2. Partie expérimentale 25

2.2.I. Techniques utilisées 25

2.2.I.I. Hydroxylation par processus radicalique

- Solubilisation du substrat flavonique
- Conduite de l'hydroxylation
- Isolement
- Séparation chromatographique
- Caractérisation de flavones hydroxylées formées

2.2.I.2. Rendement de la réaction

2.2.2. Résultats 33

2.2.2.I. Hydroxyflavones formées par processus radicalique 33

2.2.2.2. Etude des facteurs conditionnant le rendement de la réaction 35

1 - Solutions flavoniques en équilibre avec l'oxygène de l'air

2 - Etude comparative de l'hydroxylation réalisée en présence soit d'oxygène pur, soit de peroxyde d'hydrogène.

2.2.2.3. Identification des nouveaux corps formés..... 43

2.2.2.4. Préparation des flavones hydroxylées sur le noyau phényle latéral en 4' et 3'..... 45

2.3. Discussion 47

2.3.I. Formation du radical libre par voie chimique. Données bibliographiques 47

- Réactif de Fenton

- Réactif d'UDENFRIEND

2.3.2. Comportement des flavones sous l'action du radical libre hydroxyle 50

- Orientation de l'hydroxylation

- Intérêt biogénétique de ces résultats

2.3.3. Rendement de la réaction 53

3. Deuxième partie - FORMATION DE L'HYDROXY-3 FLAVONE (FLAVONOL) PAR PROCESSUS IONIQUE 57

3.I. Introduction 59

3.2. Partie expérimentale 61

3.2.I. Formation du flavonol au cours de processus radicaliques..... 61

3.2.I.I. Hydroxylation radicalique par voie chimique

A - Techniques utilisées

B - Résultats

page

3.2.I.2. Hydroxylation radicalique par voie radiochimique

3.2.2. Formation du flavonol après inhibition du processus radicalique 66

3.2.2.I. Suppression des ions métalliques

3.2.2.2. Addition d'un solvant organique

3.2.3. Obtention de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane 68

3.2.3.I. A partir de la flavone

3.2.3.2. Par synthèse

3.2.4. Synthèse du flavonol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane. Etude du réactif hydroxylant : acide ascorbique - peroxyde d'hydrogène..... 70

3.2.4.I. Rendement de la réaction 70

A - Techniques utilisées

B - Résultats

3.2.4.2. Mécanisme de la réaction : rôle de chacun des constituants du réactif 77

3.2.5. Comportement de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane sous l'influence d'un peracide 80

3.2.5.I. Etude des conditions optimales de la réaction 80

3.2.5.2. Identification de l'intermédiaire formé lors de la synthèse du flavonol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane traité par un peracide 82

A - Préparation

B - Propriétés

C - Structure

3.2.6. Application de la réaction à la préparation de quelques hydroxy-2 dibenzoylcarbinols..... 87

3.2.6.I. Préparation des hydroxy-2 dibenzoylméthanes

3.2.6.2. Synthèse des hydroxy-2 dibenzoylcarbinols

page

- Méthoxy-4' hydroxy-2 dibenzoylcarbinol
- Diméthoxy-4,4' hydroxy-2 dibenzoylcarbinol
- Méthoxy-4 hydroxy-2 dibenzoylcarbinol
- Benzoyloxy-4 hydroxy-2 dibenzoylcarbinol

3.3. Discussion 93

3.3.I. Formation du flavonol au cours de processus radicaliques hydroxylants 93

3.3.I.I. Par voie chimique

3.3.I.2. " " radiochimique

3.3.2. Formation du flavonol après inhibition du processus radicalilique hydroxylant 95

3.3.3. Formation du flavonol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane par action du réactif acide ascorbique-peroxyde d'hydrogène... 96

3.3.4. Comportement de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane traité par un peracide 98

3.3.4.I. Mécanisme de la réaction

3.3.4.2. Propriétés des hydroxy-2 dibenzoylcarbinols

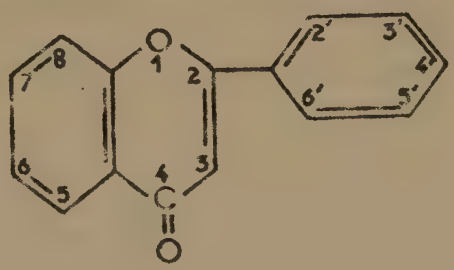
3.3.5. Interprétation générale des résultats 105

CONCLUSIONS 109

BIBLIOGRAPHIE 111

INTRODUCTION

Le noyau phényl-2 chromone, ou flavone, est l'un des constituants importants des pigments végétaux. Il existe à l'état naturel surtout sous forme de dérivés polyhydroxylés, libres ou substitués par divers groupements.



Phényl - 2 chromone

L'examen du comportement d'un tel noyau sous l'influence de divers réactifs oxydants n'a encore été que très partiellement abordée. A part les études dégradatives que nous exposerons, on ne retrouve dans la littérature que les essais réalisés par certains auteurs à l'aide du persulfate de potassium en milieu alcalin, réactif qui oxyde préférentiellement les dérivés phénoliques en para, la position ortho n'étant atteinte que secondairement.

Le Laboratoire de Chimie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, où ce travail a été réalisé en liaison avec le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, poursuit depuis plusieurs années l'étude de l'hydroxylation radicalique de nombreuses molécules organiques. Il a pu être démontré que les substances hydroxylées ainsi formées et celles qui résultent d'une hydroxylation biologique étaient souvent identiques (24-87-89-90-99).

L'analyse des transformations subies par la flavone sous l'action d'un réactif chimique producteur du radical libre hydroxyle pouvait donc apporter une certaine contribution aux recherches effectuées dans le domaine de leur biogénèse.

Le système chimique utilisé, réactif d'Udenfriend (109), est composé d'une solution d'ion ferreux, chélaté à l'éthylène diamine tétracétate disodique, dont l'oxydation par l'oxygène moléculaire en présence d'acide ascorbique induit la formation du radical libre hydroxyle. Si les premiers résultats obtenus à l'aide soit de ce réactif, soit du réactif de FENTON modifié (chélate ferreux et peroxyde d'hydrogène), étaient identiques, nous avons pu prouver dans certaines con-

ditions expérimentales, que la présence d'acide ascorbique dans le réactif d'Udenfriend impliquait un second mécanisme de nature ionique, permettant la synthèse de l'hydroxy-3 flavone (flavonol).

L'étude de ce mécanisme de synthèse nous a permis de démontrer que le flavonol est formé à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol. Cette substance n'est pas encore décrite dans la littérature et nous avons été amenés à mettre au point une technique de synthèse de composés de ce type.

Après avoir rappelé l'état des connaissances actuelles quant à l'hydroxylation directe des structures flavoniques, nous avons distingué deux parties dans ce travail :

Première partie : Formation d'hydroxyflavones par processus radicalique.

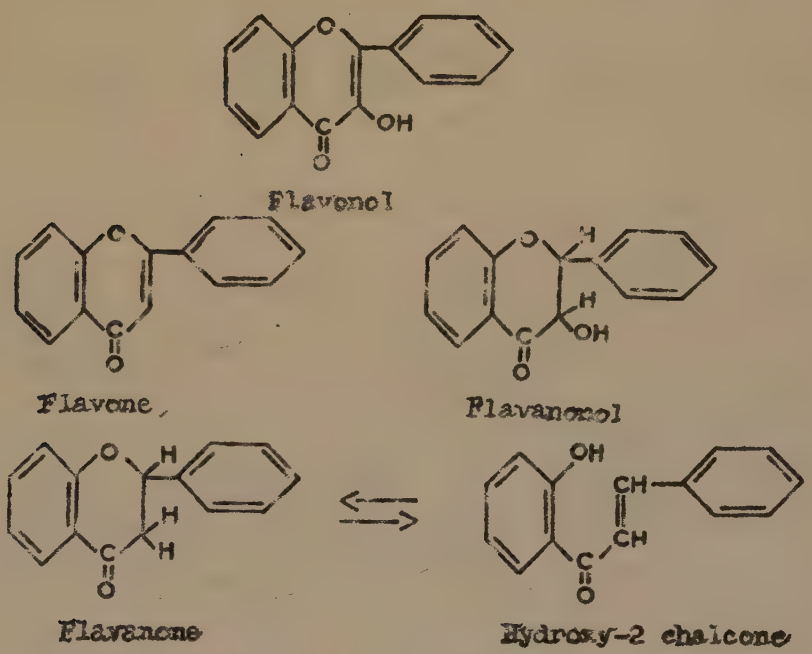
Deuxième partie : Formation de l'hydroxy-3 flavone par processus ionique.

HYDROXYLATION DIRECTE DES STRUCTURES

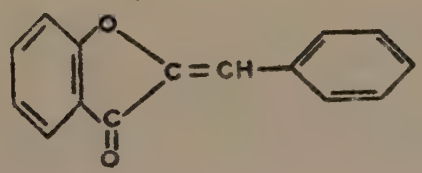
F L A V O N I Q U E S

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

De nombreux composés naturels présentent dans leur structure le noyau pyrannique. Ainsi les pigments végétaux sont constitués bien souvent par des dérivés du noyau benzopyranne, classe dans laquelle se trouvent les composés flavoniques proprement dits, dérivés du noyau phényl-2 chromone. Suivant le niveau d'oxydation de la chaine oxygénée reliant les deux noyaux benzéniques, on peut les classer en :



Certains dérivés du benzo furanne, tels les benzal-2 coumaranones-3 (aurones)



ont été trouvées ces dernières années dans les végétaux et des rapports biogénétiques ont pu être mis en évidence entre ces deux grands groupes de composés chimiques.

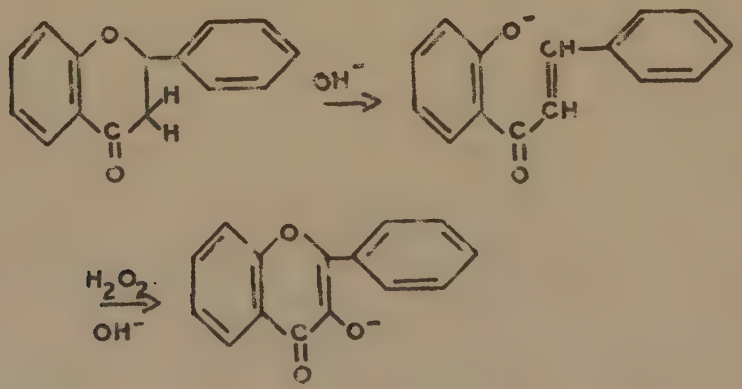
Ils existent à l'état naturel surtout sous forme polyhydroxylée en les positions 5, 7, 3', 4', pour les dérivés flavoniques proprement dits. L'étude chimique de l'hydroxylation de ces substances n'a encore été que très partiellement entreprise.

Nous verrons, après l'exposé des résultats qui ont été obtenus en utilisant divers réactifs chimiques, les données qui peuvent être dégagées ainsi que leur intérêt biogénétique.

I.I. Utilisation du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin

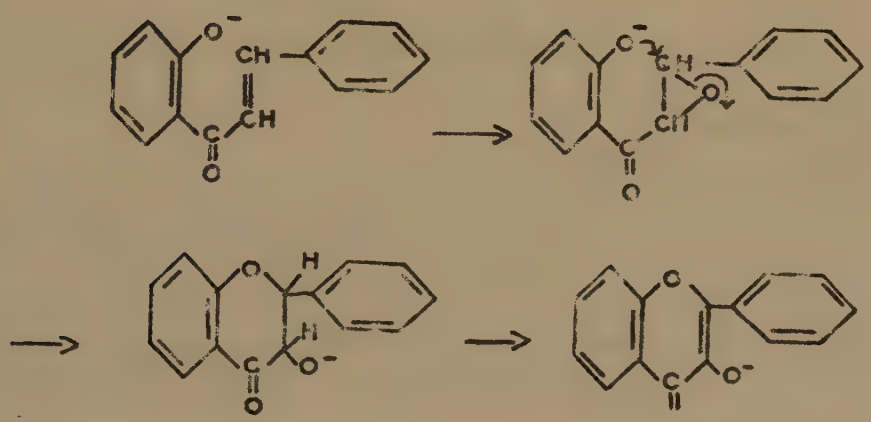
I.I.I. Etude des flavanones et des hydroxy-2 chalcones

En 1934, ALGAR et FLYNN (3), OYAMADA (92) décrivaient la synthèse du flavonol par action du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin sur les flavanones ou leurs isomères, les hydroxy-2 chalcones.



Cette réaction de synthèse a fait depuis l'objet de nombreux travaux. MURAKAMI et IRIE (85) ont montré que, dans des conditions douces, la première étape de la réaction se caractérisait par la formation de flavanonol à partir d'un composé oxydé, mais c'est seulement en 1942 que, les premiers, REICHEL et STEUDEL envisagent une interprétation électronique de cette réaction (98).

Leur schéma réactionnel a été simplifié et on admet actuellement que le premier intermédiaire obtenu à partir de l'hydroxy-2 chalcone serait un époxyde. L'attaque nucléophile d'un oxygène anionique sur le carbone β conduirait à la formation de flavanonol, oxydé en milieu alcalin en flavonol (44).



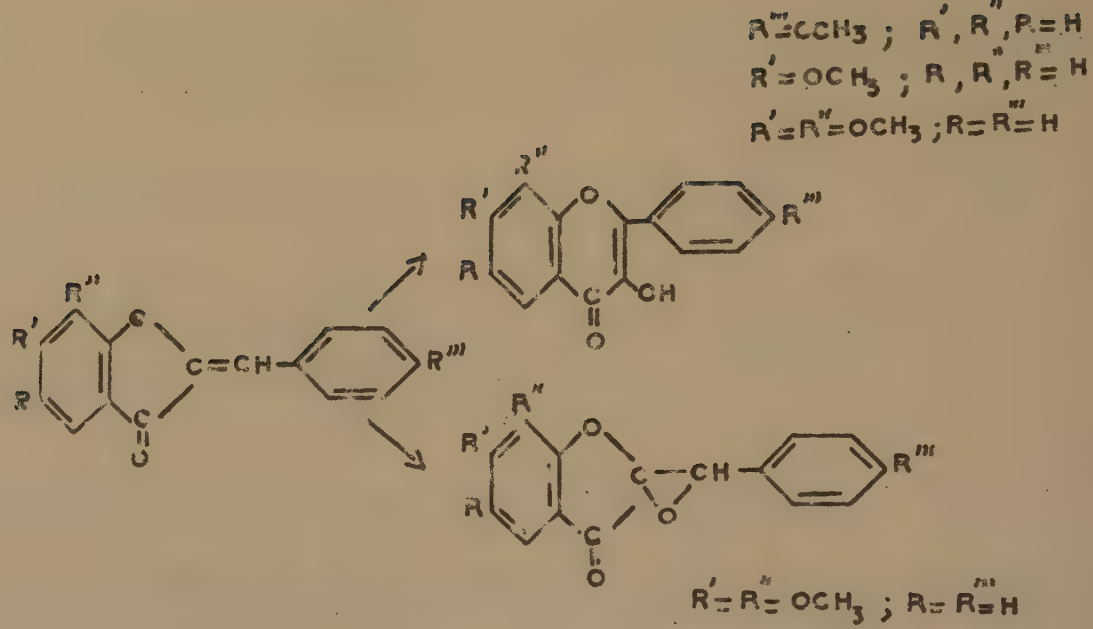
Cette technique a été utilisée pour la synthèse notamment des hydroxy-7,8 et 6, 7, 8 flavonols (11).

Mais l'influence des substituants des noyaux aromatiques de l'hydroxy-2 chalcone n'est pas négligeable dans l'évolution de cette réaction.

Ainsi GEISSMAN et coll (44) ont montré que la substitution de l'hydrogène en 6 par un groupement méthoxy conduisait à la formation de la benzal-2 coumaranone-3. Cette déviation du processus réactionnel normal a été confirmée (9-30) mais son mécanisme s'explique difficilement, ANAND et coll (4) ayant observé que le flavonol se formait lorsque l'hydroxy-2 methoxy-6 chalcone était hydroxylée en 4'.

I.I.2. Etude des aurones

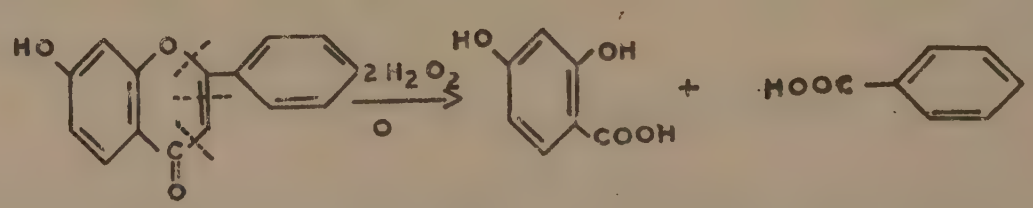
Les aurones elles-mêmes (42) ont été étudiées à l'aide du même réactif et conduisent, elles aussi, selon la nature des substituants, soit à des flavonols soit à des époxydes d'aurones.



I.I.3. Etude des flavones

L'utilisation de ce réactif sur les flavones montre un processus évolutif différent, mis à profit par MOLHO (83) en vue de l'étude structurale de ces molécules.

La réaction d'oxydation utilisée, caractérisée par l'intervention de deux molécules de peroxyde d'hydrogène et d'un atome d'oxygène (84), entraîne la formation d'acides aromatiques.



Une seule fois, MOLHO, par traitement de la dihydroxy-5,7 flavone, a pu isoler une faible quantité de dihydroxy-5,7 flavonol à côté de l'acide benzoïque de dégradation. Les conditions opératoires délicates rendent cette expérience difficile à reproduire.

Par analogie avec l'hydroxylation des hydroxy-2 chalcones, cet auteur admet

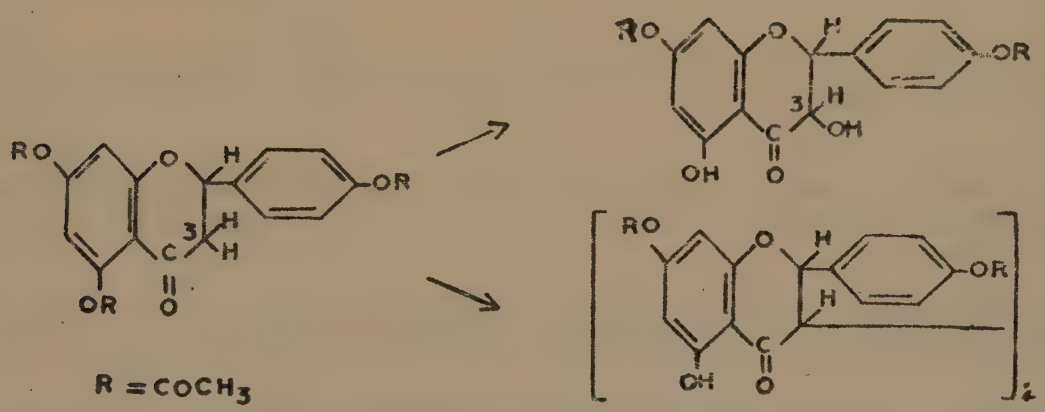
qu'après ouverture de la molécule flavonique et formation de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane, il se formerait un époxyde qui, par coupure puis par cyclisation, donnerait le flavonol correspondant.

Cette hypothèse a été en partie confirmée par les récents travaux de WHEELER (116) qui a réussi à obtenir des flavonols par action des peracides sur les hydroxy-2 dibenzoylméthanes. Ses résultats sont exposés dans la dernière partie de ce travail (§ 3.3.4.).

I.2. Utilisation du réactif de Fenton (40)

La fixation du radical libre hydroxyle engendré par le réactif de Fenton (sulfate ferreux et peroxyde d'hydrogène en solution sulfurique) et dont nous décrivons plus loin le mécanisme d'action, a été étudiée sur les flavanones.

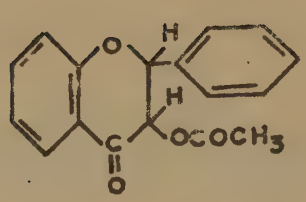
Ainsi, MAHESH et SESHADRI (72) ont pu obtenir, à partir du triacétate de naringénine (trihydroxy 5, 7, 4'-flavanone) de la diacétoxy 7, 4', dihydroxy 5,3-flavanone et un produit de dimérisation.



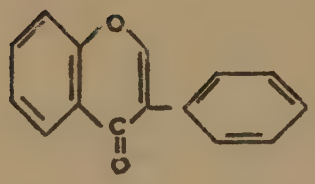
Il doit être noté que ces auteurs obtiennent également une hydroxylation en position 3 en utilisant le permanganate de potassium en milieu neutre.

I.3. Utilisation du tétracétate de plomb

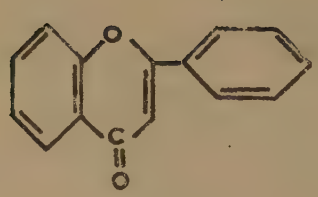
L'acétoxylation des groupements méthylènes réactifs avec le tétracétate de plomb (33), a été reprise sur les flavanones en solution dans l'acide acétique à 80°C et donne lieu à certaines anomalies. Ainsi CAVILL et COLL (22) ont obtenu de l'acétoxy-3 flavanone, de l'isoflavone et de la flavone.



acétoxy 3 flavavanone



isoflavone



flavone

Les auteurs n'expliquent pas de façon satisfaisante les transpositions obtenues à l'aide de ce réactif.

L'utilisation de ce même réactif sur les flavanes entraine aussi une hydroxylation en position 3 de ces substrats (19).

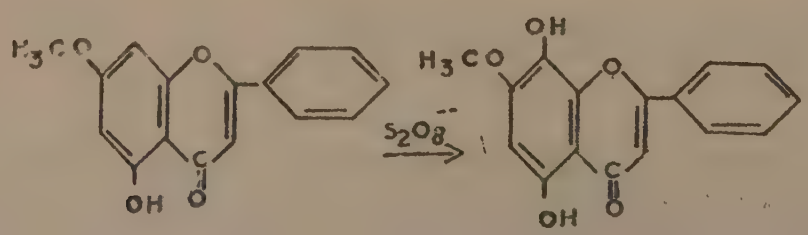
I.4. Utilisation du réactif d'Elbs (38)

L'hydroxylation des noyaux aromatiques des dérivés flavoniques n'a été réalisée jusqu'à maintenant que sous l'action du persulfate de potassium en milieu alcalin.

Ce réactif présente la propriété d'oxyder préférentiellement les composés phénoliques en para. Lorsque cette position n'est pas disponible, l'oxydation se porte en ortho.

SESHADRI et coll (101), se basant sur cette réactivité, ont pu préparer de nombreux dérivés flavoniques hydroxylés à l'aide de cette technique.

Ainsi, ils ont obtenu, à partir de l'hydroxy-5 méthoxy-7 flavone, la flavone hydroxylée en 8 correspondante.



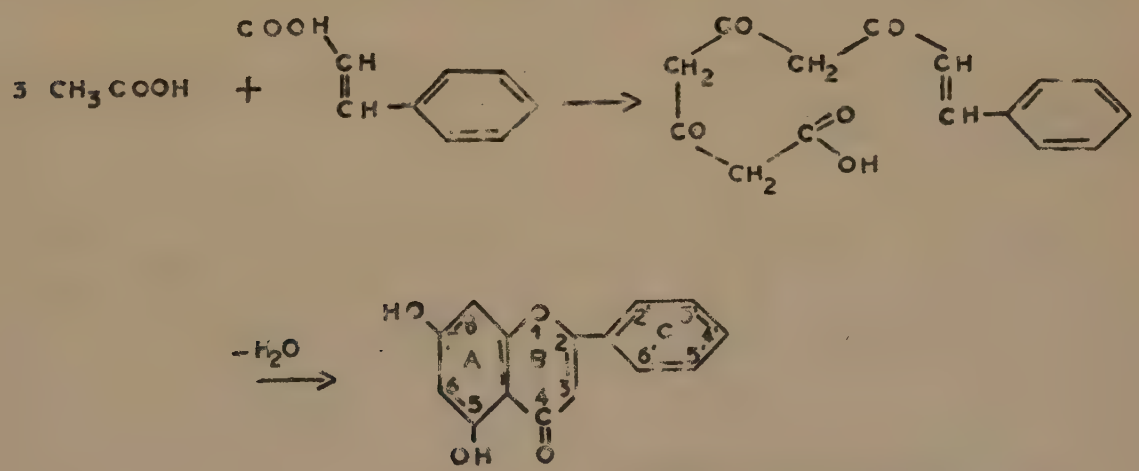
Le mécanisme d'une telle réaction est encore mal précisé et l'hypothèse de BAKER et BROWN (8) selon laquelle l'entité participant à la réaction serait l'ion radical ($.OSO_3^-$) n'a pas encore reçu de confirmations.

I.5. Intérêt biogénétique de ces résultats

La biogénèse des dérivés flavoniques (18) présente trois aspects importants :

- formation du noyau de base, la phényl-2 chromone
- hydroxylation du noyau de base
- interconversion des dérivés flavoniques.

L'administration de molécules marquées à des végétaux a permis de confirmer l'hypothèse de BIRCH et DONOVAN (15) selon laquelle le noyau phényl-2 chromone se formerait par condensation de trois unités acétiques en C_2 sur une unité en C_6- C_3 du type phénylalanine ou acide cinnamique (26 ; 27 ; 45 ; 46 ; 48 ; 110 ; 113).



Si les précurseurs de cette réaction semblent être connus, on ignore encore le mode de formation et des étapes intermédiaires et du groupement hydroxyle en position 3.

Se basant sur les résultats obtenus chimiquement, SESHADRI fait dériver les flavonols (hydroxy-3 flavones) de certains intermédiaires, type hydroxy-2 chalcones, qui seraient oxydés en flavonols suivant un processus identique à celui réalisé in vitro par action du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin.

Cependant le type de condensation que nous venons d'envisager explique l'abondance particulière des dérivés flavoniques d'origine naturelle hydroxylés sur les positions 5 et 7.

Mais la présence d'autres groupements hydroxyles en des positions différentes ne peut s'expliquer à l'aide de tels mécanismes.

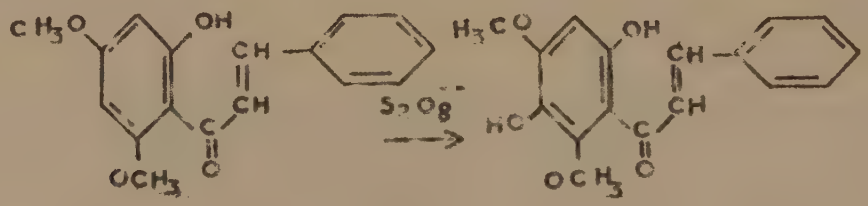
L'hydroxylation par voie chimique a pu apporter une certaine contribution aux connaissances biogénétiques acquises dans ce domaine.

I.5.I. Hydroxylation du noyau A

L'existence de flavones hydroxylées en 5, 7, 8, pourrait s'expliquer selon SESHADRI (102) par une 8-hydroxylation du noyau A par un processus similaire à celui obtenu in vitro à l'aide du réactif d'Elbs.

La présence d'un groupement hydroxyle en position 6 s'expliquerait, toujours selon cet auteur, par le même mécanisme réalisé non sur la molécule flavonique elle même, mais sur un dérivé où le noyau pyranique serait ouvert.

A l'appui de cette thèse, il a montré que l'hydroxylation de l'hydroxy-2 diméthoxy-4, 6, chalcone conduisait à la formation de la dihydroxy-2, 5, diméthoxy-4, 6 chalcone (97).



I.5.2. Hydroxylation du noyau C

Il n'est pas fait mention dans la littérature d'une hydroxylation directe du noyau C à l'aide d'un réactif chimique.

Or la plupart des dérivés flavoniques naturels sont porteurs de goupements hydroxyles sur ce noyau en 4' ; 3' 4' ; 3' 4' 5'.

L'hydroxylation biologique de ce noyau pourrait avoir lieu avant la condensation des unités acétates avec les dérivés du phénylpropane ou après la formation du squelette de base flavonique.

C'est à cette dernière hypothèse que semblent se rallier certains auteurs (46-110) après avoir constaté que la biosynthèse de la quercétine (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavonol) s'effectuait avec un meilleur rendement aux dépends de l'acide cinnamique que de l'acide dihydroxy-3,4 cinnamique.

Ainsi l'organisme végétal serait capable de réaliser l'hydroxylation de ce noyau au cours de réactions secondaires.

SESHADRI (102) se basant sur la réactivité du persulfate de potassium en milieu alcalin, pensait obtenir à partir des méthoxy-3' hydroxy-4' flavones, une ortho-hydroxylation en 5'. Elle n'a pas lieu et cet auteur admet le passage par un intermédiaire formylé.

TRAVAIL PERSONNEL

2. PREMIERE PARTIE

F O R M A T I O N D'H Y D R O X Y F L A V O N E S

P A R

P R O C E S S U S R A D I C A L I Q U E

2.I. INTRODUCTION

L'une des réactions caractéristiques qui peut être attribuée en phase aqueuse au radical libre hydroxyle, est l'attaque homolytique des noyaux aromatiques avec formation de dérivés phénoliques (23-104). D'assez nombreuses recherches ont déjà été consacrées à l'action des radicaux hydroxyles sur des substrats aromatiques variés. Les flavones cependant n'ont fait l'objet dans ce domaine d'aucune étude particulière et l'analyse du comportement de certaines d'entre elles après action d'un réactif hydroxylant à processus radicalique aurait pu apporter une certaine contribution aux connaissances acquises sur leur biogénèse.

Le réactif utilisé est le système d'UDENFRIEND (109) composé d'une solution d'acide ascorbique et d'ion ferreux chélaté par l'éthylène diamine tétracétate disodique (EDTA) traversée par un courant d'oxygène moléculaire. Ce système présente une réactivité qui a pu être attribuée aux radicaux libres hydroxyles (1-20-75). Il agit en effet sur les substrats aromatiques d'une façon analogue au réactif de FENTON (40) (peroxyde d'hydrogène-ion ferreux). Ce dernier peut d'ailleurs être lui aussi sensibilisé par chélation de l'ion ferreux à l'EDTA et par addition d'acide ascorbique comme co-réducteur (23) ; la chélation de l'ion ferreux est nécessaire car, tout en exaltant son pouvoir catalytique, elle permet sa solubilisation au pH optimal de la réaction qui est voisin de la neutralité, et évite toute réaction parasite entre les ions ferriques et les hydroxyles phénoliques engendrés.

Nous nous sommes attachés en premier lieu à rechercher quelles sont, sur les molécules à structure flavonique, les positions préférentielles qui subissent l'attaque des radicaux libres hydroxyles (121).

Nous avons étudié en second lieu les facteurs qui conditionnent le rendement d'une telle réaction.

2.2. PARTIE EXPERIMENTALE

2.2.I. TECHNIQUES UTILISEES

2.2.I.I. Hydroxylation par processus radicalique

Solubilisation du substrat flavonique

Les aglycones flavoniques, insolubles dans l'eau en milieu neutre, pourraient être solubilisées à l'aide de phases mixtes, eau-solvant organique polaire (dioxane, acétone, méthanol, formamide). Mais ces solvants, en excès par rapport aux substrats en solution, subissent par phénomène compétitif une attaque préférentielle du radical libre hydroxyle. Ainsi serait expliqué l'abaissement notable du rendement de la réaction effectuée dans ces conditions (24).

Cependant les flavones peuvent être solubilisées à la concentration de 2.10^{-4} M par ébullition dans du tampon phosphate de Soerensen de pH 7,45. La solution est alors refroidie jusqu'à 37°C. Au cours du refroidissement, on peut observer une précipitation variable selon la flavone envisagée ; les résultats demeurent néanmoins constants.

Conduite de l'hydroxylation

Les concentrations suivantes ont été réalisées en solution dans du tampon phosphate 0,067 M de pH 7,45 :

substrat flavonique : 2.10^{-4} M

sulfate ferreux, 7 H_2O , RP : 43.10^{-6} M

éthylène diamine tétracétate disodique, BLB (EDTA) : 216.10^{-6} M

acide ascorbique : 47.10^{-5} M

Le chélate ferreux est préparé extemporanément en dissolvant en présence de l'acide ascorbique, le sulfate ferreux dans la quantité requise d'EDTA en solution dans 10 ml d'eau bidistillée.

Ajouter à ce réactif la solution flavonique en tampon phosphate, préparée extemporanément selon le mode opératoire décrit. Après avoir fait passer dans le milieu réactionnel maintenu à 37°C un courant d'oxygène pendant deux heures, bloquer la réaction par addition jusqu'à pH I d'acide chlorhydrique à 20 %.

Les opérations préliminaires de préparation du réactif doivent être effectuées rapidement pour éviter une baisse de rendement consécutive à une autoxydation partielle du chélate ferreux.

Isolement

Le substrat et les produits formés sont extraits du milieu réactionnel par l'éther éthylique. Après lavage à l'eau saturée de carbonate acide de sodium pour éliminer les produits acides, la phase organique est traitée par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N qui entraine les produits phénoliques. Ces derniers, après acidification de la phase aqueuse, sont extraits par l'éther qui est ensuite évaporé.

Dans le cas particulier de l'hydroxy 4'-flavone, nous avons isolé la dihydroxy-3', 4', flavone formée par précipitation à l'acétate neutre de plomb. Le mode opératoire consiste à traiter le résidu d'évaporation éthéré, en solution dans du méthanol, par l'acétate neutre de plomb en solution hydro-alcoolique (I:I) à 20 pour 100. Recueillir le précipité formé à pH 7. A partir du précipité et du filtrat, régénérer les flavones par passage d'un courant d'hydrogène sulfuré. Eliminer le sulfure métallique par filtration. Extraire les flavones, précipitées à leur tour par addition d'eau, à l'aide d'éther.

Séparation chromatographique (119)

Les solvants classiquement utilisés pour la chromatographie des dérivés flavoniques (54) ne permettent pas la séparation de mélanges de flavones mono, di et tri-hydroxylées. Ce problème peut être résolu, semble t-il, à l'aide du mélange solvant benzène-ligroïne-méthanol-eau (50:50:I:50) décrit par LINSTEDT et MISIORNY (70) mais la réalisation de ce système solvant est délicate et les résultats obtenus ne sont pas toujours constants.

Nous avons été conduits ainsi à rechercher un solvant plus favorable : notre choix s'est finalement porté sur la méthyléthylcétone saturée par une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium 2N, solvant déjà préconisé par MEAD et coll (77) pour la résolution chromatographique des hydroxycoumarines et qui permet aussi de séparer dans de bonnes conditions les dérivés mono, di et trihydroxy flavoniques. Par ce système chromatographique, les flavones migrent sans aucune trainée, ce qui permet de caractériser des dérivés de Rf assez proches.

Le résidu d'évaporation de l'extrait éthéré, repris par l'acétone, est appliqué sous forme de trait sur le papier Whatman n° 1 préalablement lavé au méthanol, et la séparation est effectuée par chromatographie descendante au moyen du solvant : méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N.

Les flavones de Rf faible sont différenciées dans ce système à l'aide de la technique d'écoulement continu sur un temps de développement de douze heures.

Le chromatogramme est séché à la température ordinaire ; en effet, le séchage à haute température peut entrainer une adsorption irréversible d'une partie des composés sur le papier. La position des bandes séparées est repérée sous une lampe à UV. On les découpe et élue dans une cuve chromatographique avec du méthanol pendant douze heures.

Seules les hydroxy-3' et 6 flavones, de Rf 0,87 et 0,89, se séparent mal. L'éluat de la tache globale est rechromatographié dans le système solvant éther de pétrole (Eb 38-60°C) saturé de méthanol à 95°. Par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 pendant 15 heures avec écoulement continu, on parvient à séparer ces deux flavones dont les Rf sont voisins (3', 0,15 ; 6, 0,13).

L'alcalininité du solvant méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N exclut son utilisation pour la séparation des flavonols et flavones o-dihydroxylés. Ceux-ci sont isolés, avant séparation chromatographique, par précipitation à l'aide de l'acétate neutre de plomb, suivant le mode opératoire déjà décrit. La dihydroxy-3', 4' flavone ainsi séparée a été isolée par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 à l'aide du système solvant éthanol-eau-acide acétique (35:65:5).

Ces techniques ne permettent pas la séparation de quelques dizaines de milligrammes d'un mélange complexe de flavones. Obtenant une bonne séparation chromatographique à l'aide du solvant méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N, nous avons voulu conserver ces conditions opératoires. Ce problème pouvait être résolu, semble-t-il, par l'utilisation d'une colonne commercialisée sous le nom de "CHROMAX"* et déjà étudiée par LEBRETON (66) en vue de la séparation de flavones telles que la quercétine et le kaempférol. Méthode proposée par DANIELSON (31-52), il s'agit d'une feuille de papier enroulée sur elle-même autour d'un axe, la compacité de la colonne étant maintenue par un manchon latéral à pression variable. Les séparations réalisées à l'aide de cette technique sont identiques à celles réalisées en chromatographie analytique mais la capacité de séparation est considérablement augmentée.

Après fixation sur la colonne des flavones à séparer, la simple élution par la méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N et la récupération des portions éluées à l'aide d'un séparateur de fractions aurait dû nous permettre l'isolement d'une quantité appréciable de chacune des hydroxyflavones étudiées. Mais si LEBRETON a pu obtenir des résultats satisfaisants avec un solvant monophase (acide acétique -eau, 6:4), la séparation du mélange des hydroxy-4' et 3' flavones que nous avons voulue effectuer n'est pas bonne. Il semble que celle-ci soit conditionnée par la saturation en ammoniac de la cuve chromatographique, condition que l'on ne peut reproduire dans ce processus expérimental.

Devant les résultats décevants de cette technique, nous avons dû renoncer à ce mode opératoire.

---

* firme L.K.B. (Stockholm, commercialisée en France par Jarre-Jacquin (Paris)

Caractérisation des flavones hydroxylées formées

Les faibles quantités de flavones ainsi isolées et recueillies après élution, rendent nécessaires l'utilisation de microméthodes d'analyse en vue de leur identification.

I/ Etude chromatographique

Les flavones isolées sont identifiées comparativement à des témoins obtenus par synthèse d'après la valeur des Rf dans divers solvants :

- Méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N
- Butanol-acide acétique-eau (4:I:5)
- Acide acétique-eau (6:4).

Les taches sont repérées sous une lampe à UV et les fluorescences en milieu neutre et en présence de vapeurs ammoniacales sont notées.

Divers réactifs de révélation peuvent être utilisés. Nous avons employé, selon les cas :

- réactif de diazotation : pulvérisation d'acide sulfanilique diazoté (mélange d'une solution -5 ml- d'acide sulfanilique à 0,3 % dans l'acide chlorhydrique à 18 % et d'une solution -0,3 ml- de nitrite de sodium à 20 %).
- solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 1 %
- solution aqueuse de carbonate disodique à 20 %
- solution aqueuse de chlorure ferrique à 1 %.

2/ Etude spectrophotométrique

La phényl-2-chromone est caractérisée par deux pics d'absorption à 2500 et 2975 Å. La substitution des atomes d'hydrogène par des groupements hydroxyles entraine le plus souvent des effets bathochromes prononcés sur la deuxième bande (5-25-103).

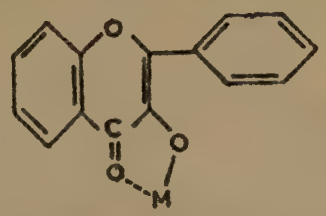
Cette étude permet à la fois la caractérisation des composés isolés et leur dosage.

La caractérisation peut être facilitée par l'emploi de certains réactifs. Ainsi une solution saturée d'acétate de sodium et d'acide borique entraine un effet bathochrome sur les solutions contenant les groupements ortho-dihydroxylés (57).

A 2 ml de la solution flavonique 0,000I M, ajouter 2 ml d'une solution saturée

d'acide borique dans l'éthanol absolu. La solution est diluée avec 6 ml d'éthanol absolu et un excès d'acétate de sodium anhydre en poudre est ajouté. Après agitation et repos 20 mn, déterminer le spectre.

La chélation par des métaux des groupements ortho-dihydroxylés ou des groupements situés en position ortho du groupement carbonyle modifie le spectre de ces composés dans le sens bathochrome (53-106).

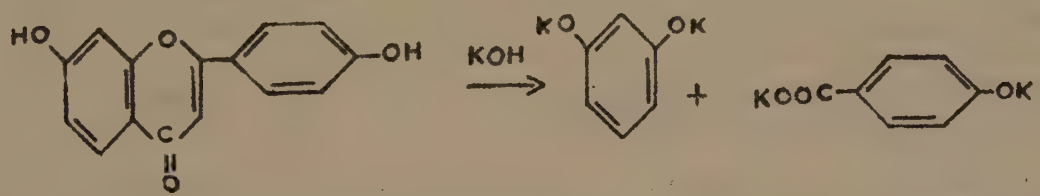


Ajouter trois gouttes d'une solution éthanolique à 5 % de chlorure d'aluminium à 2ml de la solution flavonique 0,00002 M puis déterminer le spectre.

3/ Etude dégradative

Nous avons utilisé la microméthode d'analyse structurale des dérivés flavoniques par fusion alcaline, mise au point par MAURICE et MENTZER (76).

Ainsi, à partir de la dihydroxy 7,4' -flavone, on obtient de l'acide p-hydroxy benzoïque et de la résorcine.



Le mode opératoire préconisé est le suivant :

25 mm^3 d'une solution renfermant 50 microgrammes au minimum du produit à identifier et 250 microgrammes de potasse, placés dans un tube à hémolyse, sont portés 3 mn à 210°C puis 3 mn à 280°C.

Après refroidissement, neutraliser, diluer par de l'eau et extraire par l'éther les produits formés.

Les microquantités de flavones étudiées nécessitent l'emploi de la chromato-

graphie sur papier pour l'identification des produits de dégradation formés.

A partir du résidu d'évaporation de l'extrait éthéré repris par l'acétone, nous avons séparé les acides ortho, méta et para hydroxy-benzoïques à l'aide du système solvant n-butanol saturé par une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium 1,5 N (67) sur papier Arches 302 par chromatographie ascendante. Les phénols et les acides benzoïques dihydroxylés ont été séparés grâce au système solvant benzène-acide acétique-eau (4:1:5) par chromatographie ascendante sur papier Arches 302 (93).

Ces différents dérivés ont été caractérisés suivant les cas par diazotation ou par une solution aqueuse de chlorure ferrique à 1 %.

2.2.I.2. Rendement de la réaction

Nous avons étudié les facteurs conditionnant le rendement de la réaction d'hydroxylation de la flavone dissoute en tampon phosphate en faisant varier la nature et les quantités des réactifs en présence.

La réaction est effectuée comme il a été décrit plus haut, elle est arrêtée après un temps donné par acidification.

Le mode opératoire a été le suivant :

La flavone (2.10^{-5} mole) est dissoute à l'ébullition dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen 0,067 M. La solution est alors refroidie jusqu'à la température fixée pour l'expérience.

Le réactif hydroxylant est préparé extemporanément en dissolvant dans 10 ml d'eau bidistillée le sulfate ferreux en présence ou non d'EDTA et d'acide ascorbique. Ajputer à ce réactif la flavone en solution dans le tampon phosphate et homogénéiser. La réaction s'effectue pendant un temps variable au BM, à la température fixée, par contact avec l'agent d'oxydation qui selon les cas peut être de l'oxygène pur ou l'oxygène de l'air. Dans le premier cas, faire passer au sein de la solution un courant d'oxygène, dans le second cas, laisser la solution au contact de l'air, avec ou sans agitation.

La réaction est bloquée par addition jusqu'à pH I d'acide chlorhydrique à 20 %. Extraire le substrat et les produits formés par de l'éther éthylique. Eliminer les produits acides par lavage à l'eau saturée de carbonate acide de sodium. Entrainer les produits hydroxylés formés par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N.

La phase éthérée ne contenant plus que le substrat de départ est évaporée.

Acidifier la phase aqueuse alcaline et extraire par l'éther les flavones hydroxylées. Evaporer.

Les résidus d'évaporation de ces deux solutions éthérées, contenant l'une le substrat de départ, l'autre les produits hydroxylés formés, sont dissous dans du méthanol.

L'étude du rendement de la réaction pouvait être réalisé par dosage spectrophotométrique, d'une part du substrat résiduel non attaqué, d'autre part des flavones hydroxylées obtenues.

Flavone : spectre UV : λ max, 2 500 ($\log_{\epsilon}$ 4,07) et 2 975 Å (4,20)

Par contre le dosage de chacun des produits hydroxylés obtenus nécessite une séparation prélable par chromatographie. Nous avons préféré effectuer un dosage global de ces produits, technique plus rapide, en nous basant sur les faits suivants :

- l'ensemble des flavones hydroxylées obtenues présente un spectre caractérisé par un plateau entre 3 100 et 3 300 Å.
- les proportions relatives des produits hydroxylés obtenus sont pratiquement identiques lors des variations des conditions opératoires (23).

Par hydroxylation de la flavone, nous avons obtenu les hydroxyflavones suivantes, les proportions relatives de chacune d'entre elles étant exprimées en % :

Hydroxy-4'	flavone	:	54
" 3'	"	:	40,5
" 6	"	:	3,4
" 7	"	:	1,4
Dihydroxy-7,4'	flavone	:	0,7

Nous avons alors préparé une solution étalon dans le méthanol de ces composés dans les mêmes proportions et nous avons établi à l'aide de quantités croissantes une courbe de référence à 3 100 Å.

En se référant à cette courbe étalon, on peut réaliser le dosage global des flavones hydroxylées obtenues au cours des divers essais. L'identité des produits hydroxylés formés est vérifiée par chromatographie sur papier à l'aide de méthyléthylcétone saturé d'hydroxyde d'ammonium 2N.

Le calcul du rendement exact de chacun des produits formés est effectué par dosage spectrophotométrique de chacune des taches après élution au méthanol selon le protocole déjà exposé.

2.2.2. R E S U L T A T S

2.2.2.I. Hydroxy-flavones formées par action du réactif d'Udenfriend

L'ensemble des résultats de cette étude a été groupé en deux tableaux. Dans le premier, nous donnons, pour chacun des substrats flavoniques étudiés, les proportions relatives des produits obtenus exprimés en pourcentage de l'ensemble.

Tableau I

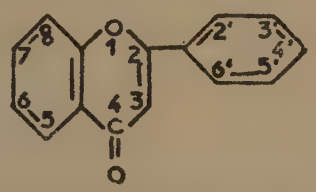
Substrat flavonique	Produits hydroxylés formés identifiés	Pourcentage
		
FLAVONE	Hydroxy-4' flavone " 3' " " 6 " " 7 " Dihydroxy-7,4' flavone	54 40,5 3,4 1,4 0,7
HYDROXY 6 FLAVONE	Dihydroxy-6,4' flavone " 6,3' "	57,1 42,9
HYDROXY 7 FLAVONE	Dihydroxy-7,4' flavone " 7,3' "	64,5 35,5
DIHYDROXY 5,7, FLAVONE	Trihydroxy-,5,7,4' flavone " 5,7,3' "	60 40
HYDROXY 4' FLAVONE	Dihydroxy-3',4' flavone " 6, 4' " " 7, 4' "	85,8 12,9 1,3

TABLEAU 2

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES FLAVONES ÉTUDIÉES.

Solvants chromatographiques : (a) : méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N.
(b) : éthanol-acide acétique-eau (35:5:65).

Réactifs de révélation : (I) : pulvérisation d'acide sulfanilique diazoté (mélange d'une solution — 5 ml — d'acide sulfanilique à 0,3 p. 100 dans l'acide chlorhydrique à 18 p. 100 et d'une solution — 0,3 ml — de nitrite de sodium à 5 p. 100) puis d'une solution aqueuse de carbonate neutre de sodium à 20 p. 100.
(II) : solution éthanolique de trichlorure d'aluminium à 1 p. 100.
(III) : solution aqueuse de carbonate disodique à 20 p. 100.
(IV) : solution aqueuse de chlorure ferrique à 1 p. 100.

Abréviations utilisées : Bz : acide benzoïque ; fluorescences (fl.) et colorations : V : violet ; Br : brun ; J : jaune ; B : bleu ; Or : orangé ; Ve : vert.

Flavones	Rf	Révélations				Spectre (méthanol)				Produits d'oxydation alcaline	
		Fluorescence		Diazot.	Réactions diverses						
		atm. normale	atm. NH_3			λ max (Å)	log.ϵ	λ max (Å)	log.ϵ	Noyau A	Noyau C
Flavone	(a) 0,95				(II) : fl. V	2500	4,07	2975	4,20		
4' - OH flavone	» 0,69	B-V	B-J			2550	3,92	3300	4,37		p-OH Bz
3' - OH flavone	» 0,87	V	J	+		2450	4,15	2980	4,21		m-OH Bz
6 - OH flavone	» 0,89	V	Or	+		2700	4,32	3050	4,07		
6,3' - di OH flavone	» 0,65	V	J	+		2675	4,35	3275	4,17		m-OH Bz
6,4' - di OH flavone	» 0,35	J	J	+		2725	4,13	3250	4,48		p-OH Bz
7 - OH flavone	» 0,40	J	J			2530	4,05	3100	4,25	résorcine	
7,3' - di OH flavone	» 0,12	J	J	+		2500	4,17	3150	4,22	résorcine	m-OH Bz
7,4' - di OH flavone	» 0,03	B-V	B-Ve		(III) : B-Ve	2500	4,12	3275	4,57	résorcine	p-OH Bz
5,7 - di OH flavone	» 0,62	Br	Br	+	(IV) : Br	2700	4,42	3150	3,90	phloroglucine	
5,7,3' - tri - OH flavone	» 0,21	Br	J	+	» : Br	2680	4,36	3225	4,07	phloroglucine	m-OH Bz
5,7,4' - tri OH flavone	» 0,08	Br	J	+	» : Br	2690	4,31	3350	4,32	phloroglucine	p-OH Bz
3',4' - di OH flavone	(b) 0,40	V	J	+	» : Ve	3100	4,38	3425	4,52		3,4 di OH Bz

Le second tableau, permet à l'aide des techniques d'isolement et de caractérisation que nous avons exposées, de distinguer rapidement les caractères analytiques de chacune des flavones que nous avons étudiées.

2.2.2.2. Etude des facteurs conditionnant le rendement de la réaction

Tous les essais ont été effectués sur le même substrat, la flavone (2.10^{-5} mole), en solution dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen 0,067 M pendant 30 mn (sauf lors de l'étude cinétique). Afin d'obtenir une plus grande reproductibilité des résultats, une grande partie de ces expériences a été réalisée avec des solutions au contact de l'air, dans des béchers de dimension identique (hauteur 9 cm, diamètre 6,5 cm).

1/ Solutions flavoniques au contact de l'oxygène de l'air

A. Influence du pH

L'action du pH a été étudiée à 37°C entre des valeurs de 5,4 à 8 avec des concentrations de réactif voisines de celles préconisées par Udenfriend : EDTA, 2.10^{-5} mole ; $FESO_4$, $0,5.10^{-5}$ mole ; acide ascorbique, 4.10^{-5} mole.

D'après les résultats obtenus, le pH optimal est de 7,5

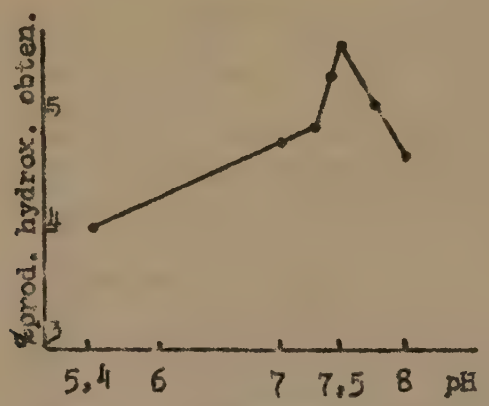


fig. I - Influence du pH

B. Influence du rapport EDTA/Fe^{2+}

Les quantités de sel ferreux ($0,5.10^{-5}$ mole) et d'acide ascorbique (4.10^{-5}mole) demeurant constantes, nous avons fait varier les quantités d'EDTA dans les rapports compris entre 0 et 8. Le mélange réactionnel, en solution à pH 7,5, est maintenu à 37°C.

Le rapport optimal EDTA/Fe^{2+} est égal à I.

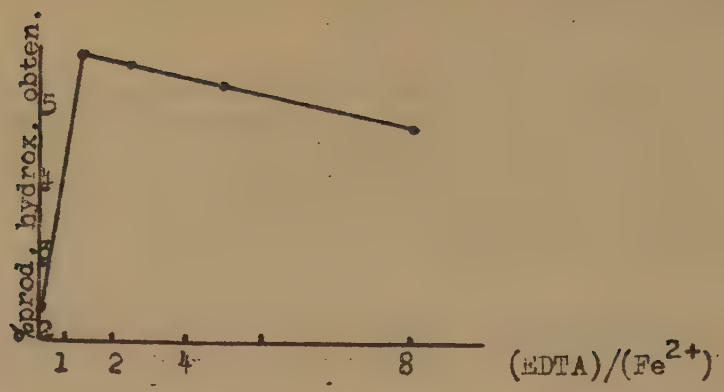


fig. 2 - Influence du rapport (EDTA)/(Fe^{2+})

C. Influence du rapport acide ascorbique/EDTA-Fe^{2+}

L'action de l'acide ascorbique sur l'oxydation induite par l'EDTA ferreux a été étudiée avec EDTA ($0,5.10^{-5}$ mole et sulfate ferreux ($0,5.10^{-5}$ mole) des quantités d'acide ascorbique, variant de 0 à $1,6.10^{-4}$ mole.

Les expériences, réalisées à pH 7,5 et à 37°C, montrent que l'exaltation provoquée par l'acide ascorbique a lieu sans rapports équimoléculaires avec les autres éléments du réactif.

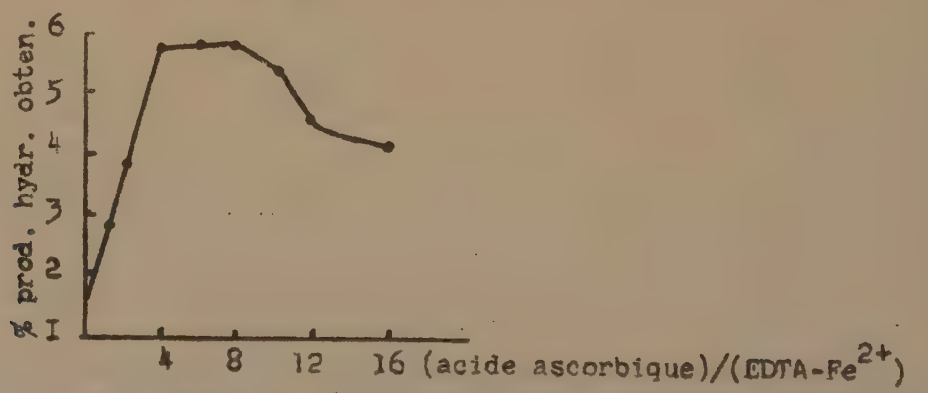


fig. 3 - Influence du rapport (acide ascorbique)/(EDTA-Fe^{2+})

D. Influence du rapport EDTA-Fe^{2+} acide ascorbique/substrat.

En maintenant constante la concentration du substrat, nous avons fait varier tout le réactif hydroxylant maintenu dans un rapport constant (EDTA-Fe^{2+}, I:I, acide ascorbique, 5).

Ce rapport variant de 0,1 à 2,5 (base de calcul : ion ferreux/substrat) la réaction est effectuée à pH 7,5 et à 37°C. Le rendement est maximal lorsque le rapport est égal à 0,25.

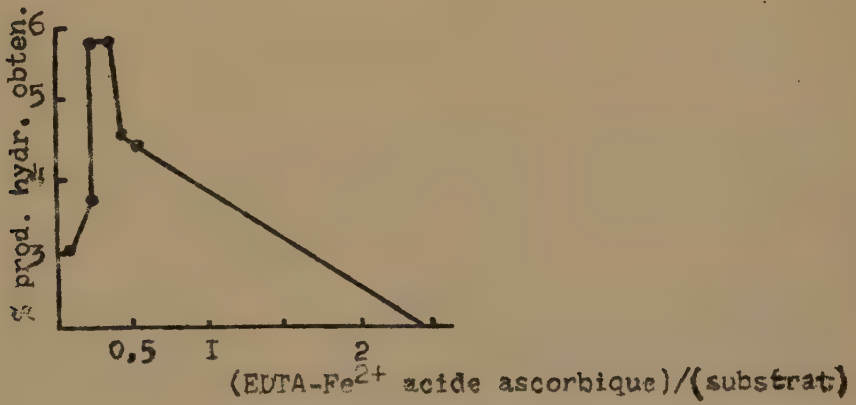


fig. 4- Influence du rapport (EDTA-Fe^{2+} acide ascorbique)/(Substrat)

E. Influence de la température.

A pH 7,5, le rendement de la réaction a été mesuré entre 3 et 90°C pour les quantités suivantes : EDTA, $0,5.10^{-5}$ mole, $FeSO_4$ $0,5.10^{-5}$ mole, acide ascorbique, $2,5.10^{-5}$ mole.

Il est optimal pour des températures voisines de 74-75°C.

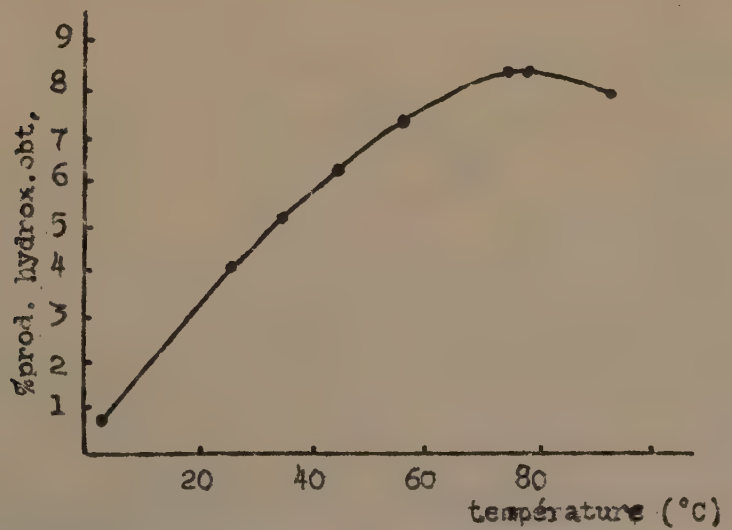


fig. 5- Influence de la température

F. Influence du rapport EDTA-Fe^{2+}/substrat

En maintenant égal à I le rapport EDTA-Fe^{2+} et en supprimant l'acide ascorbique, à 75°C et à pH 7,5, nous avons fait varier les rapports de l'ion ferreux chélaté au substrat de 0,25 à 4.

Dans ces conditions, le rapport optimal est de I.

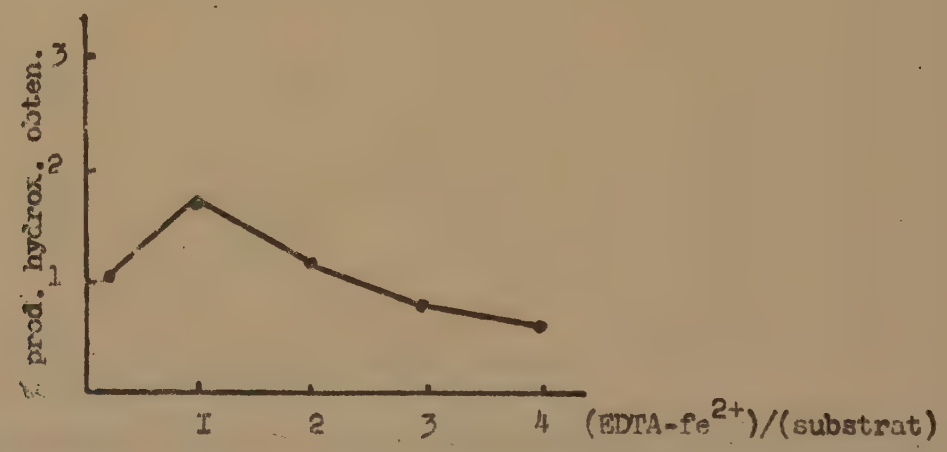


fig. 6- Influence du rapport (EDTA-Fe^{2+})/(substrat)

G. Cinétique de la réaction

L'étude cinétique a été effectuée à pH 7,5 à une température de 75°C, avec des quantités optimales de réactif ; EDTA, $0,5.10^{-5}$ mole, $FeSO_4$, $0,5.10^{-5}$ mole acide ascorbique, $2,5.10^{-5}$ mole.

L'hydroxylation s'effectue rapidement pour se stabiliser ensuite après 90 mn.

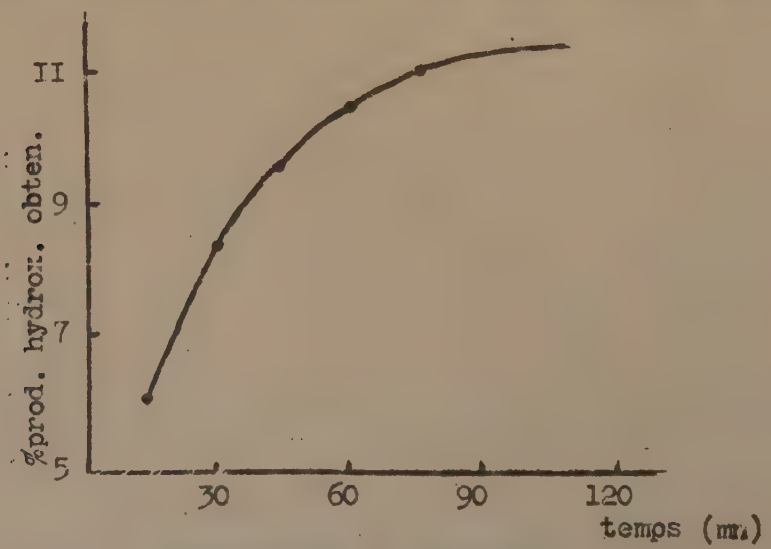


fig. 7- Cinétique de la réaction

H. Influence de l'agitation

- Valeur du rapport EDTA-Fe^{2+} acide ascorbique/substrat.

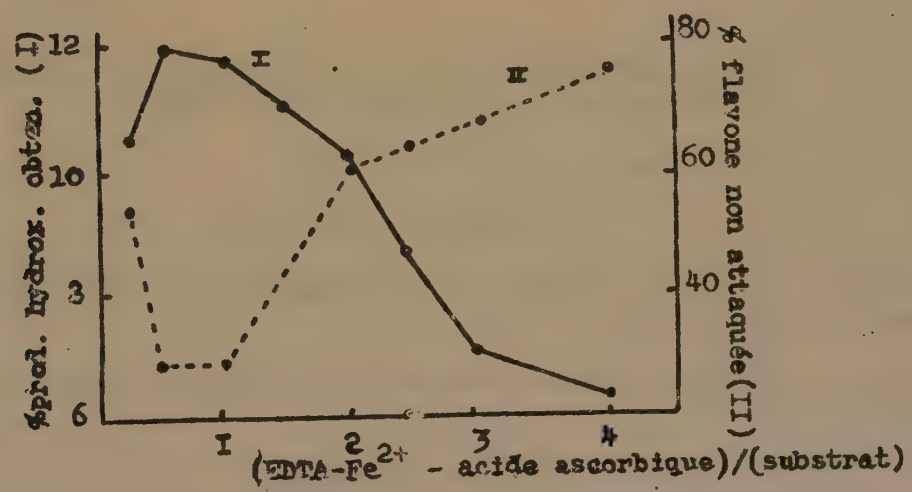
On réalise une agitation mécanique (1 500 t/mn) de la solution en contact avec l'air.

Nous avons fait varier le rapport réactif hydroxylant (EDTA : I, $FeSO_4$: I, acide ascorbique : 5) au substrat entre des valeurs de 0,25 à 4.

A pH 7,5 et à 75°, la réaction est optimale pour un rapport de 0,5. Pour des valeurs supérieures, l'hydroxylation est inhibée.

L'étude chromatographique à l'aide de méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N des produits hydroxylés obtenus au cours de chacun de ces essais, montre l'apparition, à partir d'une valeur du rapport égale à 0,35, de deux nouvelles taches, de Rf 0,95 et 0,74, de fluorescence jaune-vert.

En maintenant la valeur du rapport à 0,25, il n'apparait que des traces de la substance de Rf 0,95 et l'hydroxylation a toujours lieu préférentiellement sur le noyau phénylelatéral en 4' puis 3'.



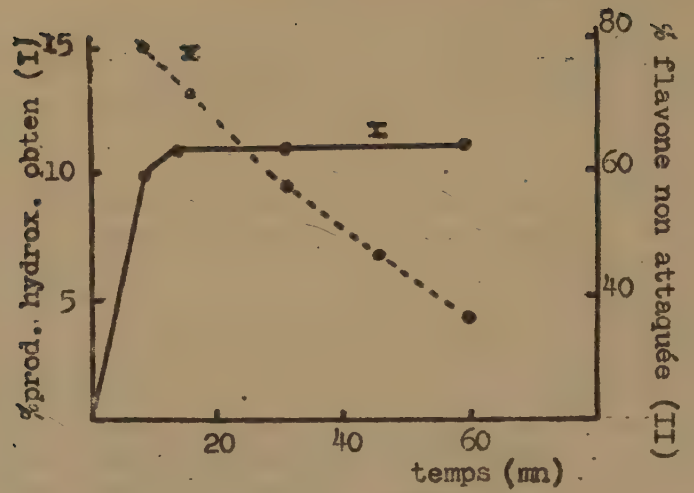
I- : % Prod. hydrox. obtn.
II- : % flavone non attaquée

fig. 8- Influence du rapport (EDTA-Fe^{2+} - acide ascorbique)/(substrat)

- Cinétique de la réaction

En maintenant à 0,25 la valeur du rapport réactif hydroxylant/substrat (EDTA, $0,5.10^{-5}$ mole, $FeSO_4$, $0,5.10^{-5}$ mole, acide ascorbique, $2,5.10^{-5}$ mole), nous avons étudié la vitesse d'apparition des dérivés hydroxylés sur le noyau C. A 75°C et à pH 7,5, le rendement est optimal en 15 mn.

Lorsque la réaction se poursuit, le rendement ne varie pas, mais la quantité de substrat non attaqué diminue.



I- % Prod. hydro. obten.
II- % Flavone non attaquée.

fig. 9- Cinétique de la réaction

2/ Etude comparative de l'hydroxylation réalisée en présence soit d'oxygène pur soit de peroxyde d'hydrogène

A. Influence de l'oxygène pur

- Réactif d'Udenfriend

Ce réactif, utilisé suivant les conditions déjà décrites, donne en 30 mn un rendement global de 2,5 %.

Nous avons exposé dans le tableau I, les résultats ainsi obtenus.

- Réactif modifié

En utilisant les quantités optimales trouvées (EDTA IO^{-5} mole, $FeSO_4$, IO^{-5} mole, acide ascorbique, $5.IO^{-5}$ mole), on fait passer au sein de la solution flavonique maintenue à pH 7,5 et à 75°C, un courant d'oxygène.

En 30 mn, le rendement global est de 6 %.

L'étude chromatographique à l'aide de méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N, des produits formés, donne les mêmes résultats. Mais il faut noter la présence du spot de Rf 0,95, dont nous avons déjà signalé la présence (§2.2.2.2.- I,H).

TABLEAU 3

Etude des facteurs conditionnant le rendement de la réaction.

Substrat : flavone, (2.10^{-5} mole), en solution dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen, 0,067 M.

Essai (n°)	pH	EDTA (mole)	$FeSO_4$ (mole)	Ac. ascorbique (mole)	Temp. (° C)	Durée (mn)	Agent d'oxydation	Rendt. (°/o)
1	5,4	2.10^{-5}	$0,5.10^{-5}$	4.10^{-5}	37	30	oxygène (air)	3,8
2	6	-	-	-	-	-	-	4,3
3	7	-	-	-	-	-	-	4,7
4	7,2	-	-	-	-	-	-	4,8
5	7,4	-	-	-	-	-	-	5,2
6	7,5	-	-	-	-	-	-	5,4
7	7,7	-	-	-	-	-	-	5
8	8	-	-	-	-	-	-	4,5
9	7,5	0	$0,5.10^{-5}$	4.10^{-5}	37	30	oxygène (air)	2,5
10	-	$0,5.10^{-5}$	-	-	-	-	-	5,9
11	-	1 «	-	-	-	-	-	5,9
12	-	1,5 «	-	-	-	-	-	5,6
13	-	2 «	-	-	-	-	-	5,4
14	-	3 «	-	-	-	-	-	5,1
15	-	4 «	-	-	-	-	-	4,9
16	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	0	37	30	oxygène (air)	1,2
17	-	-	-	$0,5.10^{-5}$	-	-	-	2,8
18	-	-	-	1 «	-	-	-	3,9
19	-	-	-	2 «	-	-	-	5,8
20	-	-	-	3 «	-	-	-	5,8
21	-	-	-	4 «	-	-	-	5,8
22	-	-	-	5 «	-	-	-	5,4
23	-	-	-	7 «	-	-	-	4,5
24	-	-	-	8 «	-	-	-	4,2
25	-	-	-	16 «	-	-	-	3
26	7,5	$0,2.10^{-5}$	$0,2.10^{-5}$	1.10^{-5}	37	30	oxygène (air)	3,3
27	-	0,4 «	0,4 «	2 «	-	-	-	3,6
28	-	0,5 «	0,5 «	2,5 «	-	-	-	5,8
29	-	0,6 «	0,6 «	3 «	-	-	-	5,4
30	-	0,8 «	0,8 «	4 «	-	-	-	4,5
31	-	1 «	1 «	5 «	-	-	-	4,4
32	-	5 «	5 «	25 «	-	-	-	2
33	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	$2,5.10^{-5}$	3	30	oxygène (air)	0,9
34	-	-	-	-	26	-	-	4,2
35	-	-	-	-	35	-	-	5,2
36	-	-	-	-	45	-	-	6,4
37	-	-	-	-	55	-	-	7,3
38	-	-	-	-	65	-	-	7,8
39	-	-	-	-	73	-	-	8,3
40	-	-	-	-	75	-	-	8,4
41	-	-	-	-	78	-	-	8,4
42	-	-	-	-	80	-	-	8,3
43	-	-	-	-	90	-	-	7,8

44	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	0	75	30	oxygène (air)	1
45	-	1 «	1 «	-	-	-	-	1,2
46	-	2 «	2 «	-	-	-	-	1,6
47	-	4 «	4 «	-	-	-	-	1,1
48	-	8 «	8 «	-	-	-	-	0,6
49	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	$2,5.10^{-5}$	75	15	-	5,9
50	-	-	-	-	-	30	-	8,4
51	-	-	-	-	-	45	-	9,5
52	-	-	-	-	-	60	-	10,5
53	-	-	-	-	-	90	-	11
54	-	-	-	-	-	120	-	11,2
55	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	$2,5.10^{-5}$	75	30	oxygène (air) - agitation -	10,9
56	-	1 «	1 «	5 «	-	-	-	12
57	-	2 «	2 «	10 «	-	-	-	11,9
58	-	3 «	3 «	15 «	-	-	-	11,2
59	-	4 «	4 «	20 «	-	-	-	10,3
60	-	5 «	5 «	25 «	-	-	-	8,6
61	-	6 «	6 «	30 «	-	-	-	7
62	-	8 «	8 «	40 «	-	-	-	6,3
63	7,5	$0,5.10^{-5}$	$0,5.10^{-5}$	$2,5.10^{-5}$	75	10	oxygène (air) - agitation -	10,1
64	-	-	-	-	-	15	-	11,1
65	-	-	-	-	-	30	-	11
66	-	-	-	-	-	45	-	10,9
67	-	-	-	-	-	60	-	11
68	7,5	1.10^{-5}	1.10^{-5}	5.10^{-5}	75	30	oxygène pur - barbotage -	6
69	7,45	$2,16.10^{-5}$	$0,43.10^{-5}$	$4,7.10^{-5}$	37	30	oxygène pur - barbotage -	2,5
70	7,45	2.10^{-5}	2.10^{-5}	1.10^{-5}	37	30	H_2O_2, 4.10^{-5}	2,2

B. Influence du peroxyde d'hydrogène

Nous avons utilisé le réactif de Fenton, activé par l'EDTA et l'acide ascorbique suivant les conditions préconisées par CIER et NOFRE (23) : EDTA, 2.10^{-5} mole, $FeSO_4$, 2.10^{-5} mole, acide ascorbique 1.10^{-5} mole, peroxyde d'hydrogène, 4.10^{-5} mole.

Le mode opératoire est alors le suivant :

La solution flavonique, en tampon phosphate de pH 7,5, est placée au contact du réactif hydroxylant préparé extemporanément par dissolution dans 10 ml d'eau bidistillée des quantités requises d'EDTA, de $FeSO_4$ et d'acide ascorbique. Le peroxyde d'hydrogène est ajouté en dernier lieu.

La réaction est effectuée à 37°C pendant 30 mn.

Le rendement global est de 2,2 %.

Les produits hydroxylés formés, identifiés par chromatographie, sont identiques à ceux obtenus à l'aide du réactif d'UDENFRIEND à 37°C.

L'ensemble de ces données expérimentales est rassemblé dans le tableau 3.

2.2.2.3. Identification des nouveaux corps formés (§ 2.2.2.2.-I H)

L'hydroxylation réalisée à l'aide du réactif d'Udenfriend modifié, nous a montré l'apparition de nouveaux spots lors de l'étude analytique par chromatographie des corps formés.

Ces substances nouvelles ont pu être isolées sélectivement par précipitation à l'acétate neutre de plomb et chromatographie dans le système solvant éther de pétrole (Eb 38-60°C) saturé de méthanol à 95°.

Le mode opératoire a été le suivant :

la flavone (5.10^{-4} mole soit 111 mg) est dissoute à l'ébullition dans 2,5 litres de tampon phosphate de SOERENSEN 0,067 M, de pH 7,5. La solution est refroidie jusqu'à 75°C.

Le réactif hydroxylant est préparé extemporanément en dissolvant dans 200 ml d'eau bidistillée de l'EDTA, 1.10^{-3} mole (336 mg), du sulfate ferreux, 1.10^{-3} mole, 278 mg, et de l'acide ascorbique, 5.10^{-3} mole, 890 mg. Ajouter la solution flavonique et porter au B-M à 75°C.

Dans cette solution en contact avec l'air, réaliser une agitation mécanique à 1 500 t/mn pendant 30 mn.

Arrêter la réaction par acidification jusqu'à pH 1 à l'aide d'acide chlorhydrique à 20 %. Après refroidissement, extraire le substrat et les produits formés

par de l'éther. Laver la phase éthérée par une solution saturée de carbonate acide de sodium qui élimine les produits acides.

Evaporer la phase éthérée.

Dissoudre le résidu d'évaporation dans du méthanol et ajouter de l'acétate neutre de plomb en solution hydro-alcoolique (I:I) à 20 %.

Recueillir le précipité formé à pH 7. A partir du précipité et du filtrat, récupérer les flavones par passage d'un courant d'hydrogène sulfuré. Eliminer le sulfure métallique par filtration. Extraire les flavones précipitées à leur tour par addition d'eau, à l'aide d'éther.

L'étude chromatographique à l'aide de méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N, des résidus d'évaporation de ces extraits éthérés, montre que les nouveaux composés hydroxylés formés sont précipités sélectivement par l'acétate neutre de plomb.

Il peut s'agir, donc, soit de dérivés o-dihydroxylés soit de dérivés hydroxylés en position 3.

Le solvant chromatographique utilisé ne convient pas, nous l'avons déjà précisé, à la séparation de tels composés qui sont plus ou moins altérés en milieu alcalin.

C'est ainsi que ces flavones ont pu être séparés à l'aide du solvant éther de pétrole (Eb 38-60°C) saturé de méthanol à 95°, par chromatographie descendante sur papier Whatman n° I.

En utilisant la technique générale d'isolement chromatographique déjà exposée, nous avons pu caractériser une substance de Rf 0,81, dont la fluorescence jaune-vert en UV n'est pas modifiée par exposition à des vapeurs ammoniacales mais vire au bleu après pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution éthanolique à 1 % de chlorure d'aluminium.

Après élution, nous avons pu isoler 4 mg de cette substance que nous avons fait recristalliser dans de l'alcool à 60°.

F : 160°C

Spectre UV : λ max, 2 400 (log ε 4,43), 3 050 (4,15) et 3 440 Å (4,30)

Ce point de fusion et ce spectre sont identiques à ceux du flavonol (hydroxy-3 flavone).

Effectivement, le non abaissement du F par mélange et l'étude comparative chromatographique de ces deux composés montrent qu'ils sont identiques.

L'autre substance précipitée n'a pu être isolée en quantité suffisante pour en permettre une identification certaine.

2.2.2.4. Préparation des flavones hydroxylées sur le noyau phényle latéral en 4' et 3'.

Les techniques de solubilisation de substrats et de préparation du réactif hydroxylant sont toujours identiques mais, en fonction de l'étude précédente, les proportions utilisées ont été modifiées.

La flavone (2.10^{-4} mole soit 44,4 mg) est dissoute dans 1 litre de tampon phosphate de pH 7,5 et mise au contact du réactif hydroxylant préparé suivant les proportions suivantes :

EDTA : $0,5.10^{-4}$ mole (16,8 mg) ; $FeSO_4$: $0,5.10^{-4}$ mole (13,9 mg) ; acide ascorbique : $2,5.10^{-4}$ mole (44 mg).

Dans la solution au contact de l'air, réaliser une agitation mécanique (1 500 t/mn) à 75°C.

Après arrêt de la réaction par acidification jusqu'à pH I, l'extraction sélective des dérivés hydroxylés formés et leur isolement chromatographique par la méthyléthylcétone saturée d'hydroxyde d'ammonium 2N sont effectués suivant la technique exposée au début de cette partie (§ 2.2.I.I.).

Après élution à l'aide de méthanol de chacune des substances séparées par chromatographie et recristallisation dans l'éthanol à 60°, on isole :

- hydroxy-4' flavone,

2,60 mg, rendement : 5,5 %

F : 264-266°C (Litter. 268°C (49)) (1)

Spectre UV : λ max, 2 550 (log ϵ 3,92) et 3 300 Å (4,37)

- hydroxy-3' flavone,

2 mg, rendement : 4,3 %

F : 207°C (Litter. 208°C (65))

Spectre UV : λ max, 2 450 (log ϵ 4,15) et 2 980 Å (4,21)

- 31 mg de flavone sont récupérés à partir des solutions éthérées débarrassées des hydroxyflavones. Recristallisation dans la ligroïne (Eb 60-70°C).

D'après ce taux de flavone non attaqué, le rendement en hydroxy-4' flavone est de 19 % et en hydroxy-3' flavone de 14,4 %.

---

(1) La détermination des F a été réalisée sur bloc Maquenne.

2. 3. DISCUSSION

Afin de discuter les résultats obtenus, nous rappellerons le mode de formation du radical libre hydroxyle par voie chimique puis nous envisagerons son action sur des substrats flavoniques et le problème du rendement de telles réactions.

2.3.I. Formation du radical libre hydroxyle par voie chimique. Données bibliographiques.

Réactif de Fenton

La réaction d'initiation des radicaux libres hydroxyles par le réactif de FENTON (40) (sulfate ferreux et peroxyde d'hydrogène en milieu sulfurique) obéit selon le mécanisme d'HABER et WEISS (51) au schéma suivant :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO.$$

les ions ferriques étant eux-mêmes réduits en ions ferreux par le peroxyde d'hydrogène sous sa forme de dissociation hétérolytique.

$$HO_2^- H^+ + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + H^+ + HO_2.$$

Le radical $HO_2.$ se protolyse en engendrant l'ion radical $O_2^{-}.$ qui réduit un ion ferrique avec formation d'oxygène moléculaire (10-114).

$$HO_2. \longrightarrow H^+ + O_2.^-$$

$$O_2.^- + Fe^{3+} \rightleftarrows O_2 + Fe^{2+}$$

Cette réaction initiatrice a été modifiée. La formation de complexes ioniques transitoires, créés par appariement d'ions, suivie de collisions avec les molécules d'eau et solvatation a été envisagée (38-115).

WEISS (115) semble admettre que durant la période de vie du complexe primaire, un transfert intramoléculaire d'atomes ou de radicaux peut alors prendre place

sans quelque participation appréciable du solvant.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow (Fe^{3+}\ H_2O_2^{-})$$

qui se dissocierait lors de l'interaction avec les molécules du solvant

$$(Fe^{3+}\ H_2O_2^{-}) \longrightarrow Fe^{3+}\ OH^{-}\ aq + HO.$$

L'attaque des hydrogènes labiles des substrats non autoxydables par les radicaux libres hydroxyles fait apparaitre, à la suite de l'arrachement d'un atome d'hydrogène, dans le cas des noyaux aromatiques, un radical libre phényle. La réactivité du radical libre hydroxyle repose à la fois sur son énergie de dissociation de liaison (égale à 120 kcal. pour H...OH) et sur sa forte affinité électronique en solution aqueuse (voisine de 136 kcal) (111).

L'emplacement de la rupture homolytique peut être prévu et a lieu sur les positions présentant les indices de valence libre les plus élevés (96).

$$\phi\ldots H + HO. \longrightarrow \phi. + HOH$$

Le radical libre peut avoir une destinée variable. De par sa très grande réactivité, il peut réagir avec un second radical hydroxyle,

$$\phi. + HO. \longrightarrow \phi - OH$$

avec un radical perhydroxyle,

$$\phi. + HO_2. \longrightarrow \phi - OOH$$

avec de l'oxygène moléculaire,

$$\phi. + O_2 \longrightarrow \phi - OO.$$

avec un autre radical , dimérisation.

$$\phi. + \phi. \longrightarrow \phi - \phi$$

Réactif d'Udenfriend (109)

Les dernières études consacrées à ce réactif lui attribuent un mécanisme radicalique (1-20-75).

NOFRE et CIER (86) ont rattaché l'hydroxylation induite par ce réactif au radical libre hydroxyle formé par activation de l'oxygène moléculaire sous l'in-

fluence de l'ion ferreux chélaté, d'après une hypothèse émise par Weiss en 1935 à propos du réactif de Fenton (114).

Le processus réactionnel serait caractérisé par une étape primaire, comportant le transfert d'un électron de l'ion ferreux à l'oxygène moléculaire avec formation de l'ion radical O_2^{-},

$$Fe^{2+} + O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+} + O_2^{-}$$

l'ion radical se couplant avec un ion H^+, réagirait en tant que radical libre perhydroxyle avec un ion ferreux conduisant à l'apparition de peroxyde d'hydrogène sous forme anionique, HO_2^-

$$O_2^{-} + H^+ \longrightarrow HO_2$$

$$HO_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO_2^-$$

$$HO_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène, au contact d'un ion ferreux, peut alors se dissocier par suite d'un transfert d'électron suivant un des mécanismes décrits pour le réactif de Fenton.

WEISS (116) a aussi dans ce cas modifié son hypothèse préalable en admettant, d'après des données énergétiques, la formation transitoire d'un complexe ionique entre l'ion ferreux et l'oxygène moléculaire

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow (Fe^{3+} O_2^{-})$$

complexe primaire qui peut réagir avec un ion ferreux selon les réactions suivantes

$$(Fe^{3+} O_2^{-}) + Fe^{2+} \rightleftharpoons (Fe^{3+} O_2^{-} Fe^{2+}) \rightleftharpoons (Fe^{3+} O_2^{2-} Fe^{3+})$$

La rupture de ce complexe après collision avec les molécules d'eau solvante conduit à l'apparition du peroxyde d'hydrogène

$$(Fe^{3+} O_2^{2-} Fe^{3+}) \xrightarrow{2H^+} 2\,Fe^{3+}\,aq. + H_2O_2$$

enclanchant à son tour une réaction de Fenton.

NOFRE et CIER (86) ont étudié l'influence de chacun des facteurs participant à ce processus réactionnel. Ils ont pu montrer que les oxydations induites par l'ion ferreux étaient potentialisées à la fois par chélation avec l'EDTA et par addition d'acide ascorbique.

L'influence de l'EDTA serait due à l'abaissement du potentiel normal d'oxydo-réduction du système Fe^{3+} / Fe^{2+} qui passe de +0,78 v. à + 0,12 v. par chélation (123).

L'acide ascorbique (H_2A) pourrait jouer un rôle de co-réducteur, transformant l'ion ferrique en ion ferreux

$$H_2A + 2\ Fe^{3+} \longrightarrow 2\ Fe^{2+} + 2\ H^{+} + A$$

Mais ces molécules organiques peuvent, elles aussi, réagir avec les radicaux libres hydroxyles et subir certains phénomènes dégradatifs. Ainsi l'EDTA est détruite avec formation de glycocolle (87).

Le pH optimal de cette réaction est voisin de la neutralité. Ce fait a été rattaché, d'après la valeur des pK des chélates ferreux, à une participation préférentielle du chélate "quinquidenté".

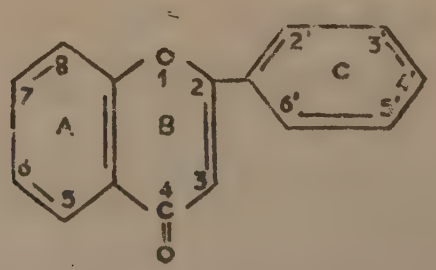
La réaction est optimale lorsque le rapport EDTA-Fe^{2+} est équimoléculaire, ce qui démontrerait la nécessité de non saturation d'au moins une des liaisons covalentes du fer.

Ces auteurs enfin, n'ont pu mettre en évidence un rapport moléculaire entre l'acide ascorbique et les autres éléments du système.

2.3.2. Comportement des flavones sous l'action du radical libre hydroxyle

Orientation de l'hydroxylation

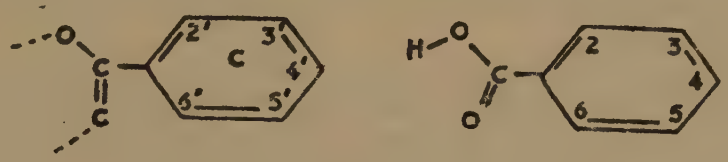
Sous l'influence du réactif d'Udenfriend, l'hydroxylation s'oriente préférentiellement sur le noyau phényle latéral (C) au niveau des positions 4' puis 3' dans le cas même où le noyau chromone est porteur de groupements hydroxyles. L'hydroxylation ultérieure de ce noyau lorsqu'il n'est pas substitué a lieu sur les positions 6 et 7 (Tableau I).



L'emplacement de la rupture homolytique lors de l'attaque radicalique se trouve sur les positions présentant les indices de valence libre les plus élevés. De tels calculs n'ayant pas encore été effectués sur le noyau phényl-2 chromone, il nous est difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux que la théorie permettrait de prévoir.

Néanmoins, nous essayerons de discuter ces résultats en fonction de ceux qui ont été établis sur d'autres substrats.

Le noyau phényl latéral flavonique semble présenter une certaine analogie avec l'acide benzoïque.



NOFRE et CIER (86) ont montré que la substitution homolytique des atomes d'hydrogène de cet acide par des groupements hydroyles se portait préférentiellement sur les positions ortho > para > méta.

Il est remarquable que nous n'ayons jamais pu caractériser les hydroxy-2' flavones qui auraient dû se former si l'attaque se réalisait de façon identique sur le noyau phényle latéral flavonique (C).

Il semble qu'il faille rattacher un tel phénomène à la configuration spatiale de la flavone. Molécule plane (69), les positions situées sur le noyau phényle latéral en 2' et 6' se trouvent très prés du noyau hétérocyclique de la molécule. Cette particularité rend ces positions difficilement accessibles à l'attaque chimique de divers réactifs. On doit noter d'ailleurs qu'on ne trouve que très peu de flavones hydroxylées sur ces positions à l'état naturel. C'est la position 4' qui, de par sa configuration spatiale, est la plus apte à subir l'attaque des radicaux libres hydroxyles.

La présence d'un substituant de nature phénolique oriente typiquement l'hydroxylation radicalique en ortho > para > méta. Ainsi, à partir de l'acide o-hydroxy benzoïque, CIER et NOFRE (23) ont caractérisé les acides hydroxy-2,3 et 2,5 benzoïques (1,7/I).

Nous avons de même noté une o-hydroxylation préférentielle : à partir de l'hydroxy-4' flavone, nous avons obtenu surtout de la dihydroxy-3', 4' flavone (85,8 %).

Cependant, lorsque nous avons étudié des substrats préalablement hydroxylés sur le noyau A (hydroxy-7 flavone, dihydroxy-5,7 flavone), nous n'avons jamais pu mettre en évidence une o-hydroxylation préférentielle (formation des hydroxy 6,7 ou 7,8 ou 5, 6, 7, flavones) et dans ce cas aussi l'hydroxylation se porte en

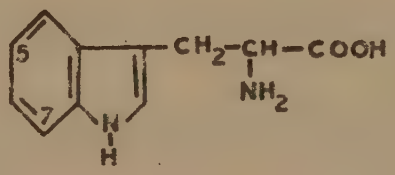
premier lieu sur le noyau phényle latéral.

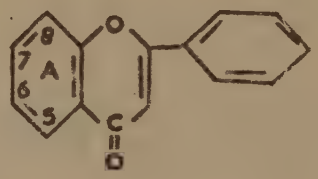
Plusieurs hypothèses peuvent être émises mais il semble qu'on puisse rattacher un tel phénomène à la rapidité de l'hydroxylation en 4', suivie d'une o-hydroxylation sur ce noyau.

Cependant, il ne faut pas négliger d'autres facteurs, notamment la labilité des molécules o-dihydroxylées et la difficulté présentée pour leur isolement et leur identification lorsqu'il ne se forme que quelques microgrammes de ces produits. Il est donc possible que de tels composés puissent être obtenus, mais dans les conditions opératoires utilisées, nous ne sommes jamais parvenus à les identifier.

Nous avons mis en évidence une hydroxylation du noyau A. Les rendements sont extrêmement faibles et nous n'avons réussi à identifier que les dérivés hydroxylés sur les positions 6 et 7.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec ceux que NOFRE et coll (87) ont obtenu à partir du tryptophanne sous l'influence des radicaux libres hydroxyles. Cette molécule n'est pas sans présenter quelque analogie avec le noyau chromone de la flavone : dans les deux cas, un noyau aromatique est accolé à un noyau hétérocyclique.





La molécule de tryptophanne est hydroxylée par mécanisme radicalique sur le noyau aromatique préférentiellement en 5 et peut être en 7.

De même le noyau A de la flavone est hydroxylée en 7, position analogue à la position 5 du tryptophanne. Par contre, on ne retrouve pas sur cette molécule une hydroxylation qui corresponde à la substitution homolytique qui a lieu en 6 sur la flavone.

Nous n'avons jamais pu mettre en évidence une hydroxylation de la flavone sur les positions 8 ou 5. La même prudence dans l'interprétation des résultats doit toujours être de rigueur et il nous faudra considérer trois cas possibles :

- non hydroxylation sur ces positions
- destruction de la molécule dans le milieu réactionnel
- non identification des produits formés, due à la faiblesse du rendement.

Enfin il nous faut souligner l'originalité des résultats obtenus : l'orientation de l'hydroxylation due à l'attaque du radical libre hydroxyle sur les flavones se différencie totalement des résultats qui ont été observés sur divers substrats flavoniques traités par certains réactifs oxydants ou hydroxylants (§ I).

Ainsi l'hydroxylation en position 3 (formation de flavanonol ou de flavonol) obtenue par attaque du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin sur les flavanones, hydroxy-2 chalocones ou aurones, n'a plus lieu. Il en est de même avec le réactif de Fenton en milieu acide sur les acétoxy-flavanones. Il faut noter qu'à l'aide de ce réactif, SESHADRI et coll (72) avait réussi à isoler un dimère à partir de la flavanone étudiée.

Nous n'avons pu mettre en évidence une dimérisation à partir des flavones traitées par le réactif d'UDENFRIEND. En effet, nous avons opéré dans un milieu saturé par de l'oxygène moléculaire, et d'après BAXENDALE (13), la dimérisation serait inhibée par suite de la formation préférentielle d'un radical libre peroxyde à partir de l'oxygène moléculaire et du substrat en solution sous forme radicalique.

Enfin, les résultats obtenus à l'aide du réactif d'Elbs ne sont pas retrouvés.

Intérêt biogénétique de ces résultats

La nécessité d'un agent réducteur et d'oxygène moléculaire, l'incorporation de ce dernier dans le noyau aromatique (74), ont conduit MASON (73) à assimiler le système d'Udenfriend aux systèmes enzymatiques de type "oxydase à fonction mixte" qui présentent des activités oxydo-réductrices couplées demandant à la fois des accepteurs d'oxygène et des donneurs de deux électrons. Quel que soit le degré de similitude, encore hypothétique, du réactif d'Udenfriend avec certains systèmes enzymatiques, nous avons recherché s'il pouvait exister quelques rapports entre les résultats obtenus sur les flavones avec ce réactif et les données biogénétiques actuellement connues.

Nous avons montré que la formation du noyau phényl-chromone par condensation de trois unités acétate et d'acide cinnamique expliquait l'abondance particulière des dérivés flavoniques d'origine naturelle hydroxylés sur le noyau A en 5 et 7. Il est admis aussi que l'hydroxylation du noyau A en d'autres positions, notamment en 6 et celle du noyau C devaient être postérieures à la formation du noyau phényl-chromone.

Nos résultats expérimentaux démontrent que, contrairement aux réactifs oxydants classiques, un système à processus radicalique était capable de réaliser de telles hydroxylations sur des substrats flavoniques. Il est possible que l'hydroxylation biologique de ces substances soit réalisée suivant un tel mécanisme.

2.3.3. Rendement de la réaction

Le système d'Udenfriend, utilisé dans les conditions décrites par son auteur, conduit à un rendement en produits hydroxylés très faibles - 4 % dans le meilleur des cas pour l'hydroxy-4' flavone - accompagné d'une dégradation poussée du substrat, dont 60 % environ disparaissent du milieu réactionnel avec formation d'acides benzoïques hydroxylés sans qu'il soit possible de retrouver des flavones poly-

hydroxylées plus fragiles.

Ce rendement pouvait être amélioré en modifiant ce réactif, tout au moins les concentrations de ses constituants, et la température qui avait été fixée arbitrairement à 37°C.

L'étude ainsi entreprise sur les flavones concorde pleinement avec les données établies par NOFRE et CIER (86) par hydroxylation de l'acide benzoïque. Les conditions optimales sont identiques : pH voisin de la neutralité ; rapport équimoléculaire EDTA-Fe^{2+}.

Les phénomènes compétitifs dus à un excès de l'un des constituants du réactif, EDTA ou acide ascorbique, causent une inhibition partielle de la réaction.

Le rendement est augmenté sous l'influence d'une élévation de température.

Cette activation thermique porterait sur l'acide ascorbique en l'absence duquel les réactions effectuées à 37°C et à 75°C (essais 16 et 44 tableau 3), sont obtenues avec un rendement sensiblement identique.

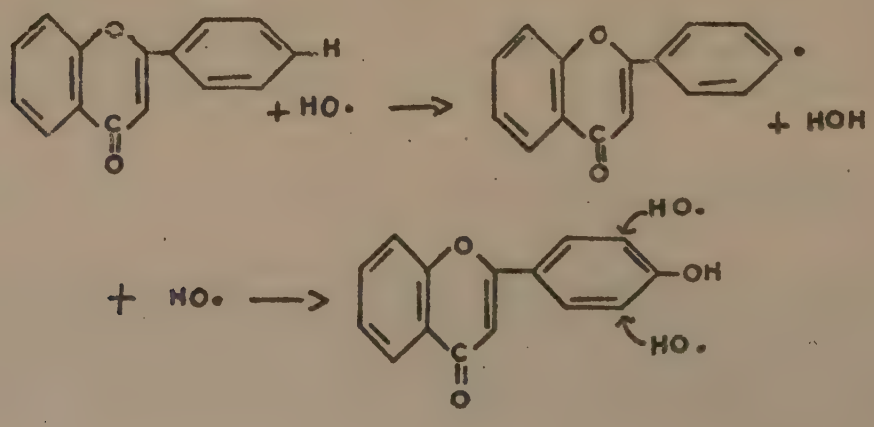
La présence d'un excès d'oxygène moléculaire abaisse de 50 % le rendement.

Il semble exister un rapport optimal oxygène-système hydroxylant, difficile à chiffrer mais réalisé empiriquement par agitation du milieu réactionnel en contact avec l'oxygène de l'air.

La réaction est rapide (fig. 9). Lorsqu'elle est poursuivie, le rendement ne varie pas, mais le taux de substrat non attaqué décroit toujours.

La cause d'une telle dégradation doit être recherchée dans le mode de formation des flavones hydroxylées.

Nous avons montré qu'après l'attaque préférentielle des flavones sur le noyau phényle latéral en 4', les groupements hydroxyles se fixent en ortho, formant successivement les dérivés 3'4' puis 3'4'5'. Ces molécules polyhydroxylées sont fragiles et sont probablement détruites dans le milieu réactionnel dès leur formation.



Un tel mécanisme explique la faiblesse du rendement et l'impossibilité de l'augmenter de façon notable. Il vaudra mieux réaliser cette hydroxylation pendant un laps de temps réduit, ce qui permet par ailleurs de récupérer à partir du milieu réactionnel, un maximum de substrat non attaqué.

La réaction utilisée suivant les conditions que nous avons définies au § 2.2.2.4. peut être utilisée pour la préparation à une très faible échelle, celle de témoins pour chromatographie par exemple, de flavones hydroxylées sur le noyau phényle latéral. Cette technique ne nous semble pas dénuée d'intérêt car elle est facile à mettre en oeuvre et elle est rapide.

Cependant, lorsqu'on modifie les conditions opératoires et notamment lorsqu'à 75°C, la valeur du rapport système hydroxylant/substrat est augmentée, il se forme de l'hydroxy-3 flavone (flavonol).

Une telle substance n'a pu être obtenue à 37°C, soit par le réactif d'UDENFRIEND, soit par le réactif de FENTON, un autre mécanisme réactionnel doit être envisagé, objet de la suite de ce travail.

---

3. DEUXIEME PARTIE

FORMATION DE L'HYDROXY 3 FLAVONE

PAR

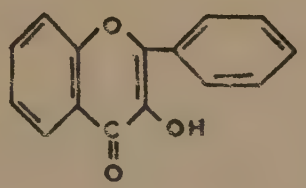
PROCESSUS IONIQUE

3.I. INTRODUCTION

Les études effectuées par WILLIAMS sur le nitrobenzène et l'acide benzoïque avaient amené UDENFRIEND et coll (21) à conclure que l'hydroxylation réalisée par oxydation de l'ion ferreux chélaté en présence d'oxygène moléculaire et d'acide ascorbique étaitde nature électrophile. Cette hydroxylation serait due à l'intervention d'un ion hydroxylant de nature cationique, attaquant les molécules sur les positions les plus chargées en électrons.

Cette hypothèse n'est plus admise, de nombreux auteurs ayant montré (1) (23) (72) que le comportement des substrats attaqués, soit par le radical libre HO., soit par le réactif d'UDENFRIEND, était identique. Le mécanisme radicalique du système d'Udenfriend n'est donc plus mis en doute. Nos premières études, réalisées sur les flavones (tableau I) étaient en accord avec ces données.

Cependant, NOFRE, REVOL et CIER (88), après l'analyse des transformations subies par les stéroïdes lors de l'attaque du radical libre HO., ont constaté que l'hydroxylation en la position IIβne survenait que sous l'action du réactif d'UDENFRIEND. Ils concluent que celui-ci procède à la fois par un mécanisme radicalique et un autre plus complexe. De même, nous avons constaté que l'hydroxylation de la flavone en la position 3 (flavonol) n'avait lieu que lorsque ce substrat était mis au contact du réactif d'Udenfriend dans des conditions de température et de concentration bien déterminées.



Une dualité entre deux mécanismes pouvait être envisagée. Ce problème fait l'objet de cette seconde partie.

Etudiant en premier lieu le comportement des flavones soumises à l'action du radical libre hydroxyle produit par voie chimique ou radiochimique, nous avons pu démontrer que le flavonol ne se formait que par action du réactif d'UDENFRIEND sur la flavone ce qui exclut à priori un seul mécanisme radicalique. Après avoir supprimé dans ce réactif les ions métalliques dont l'oxydation induit la génèse du radical libre hydroxyle, nous avons mis en évidence, au cours de la réaction effectuée sur la flavone, un dérivé intermédiaire, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane, qui donne naissance au flavonol sous l'influence d'acide ascorbique, de peroxyde d'hydrogène et de traces inévitables de catalyseurs métalliques.

Le passage de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane au flavonol avait déjà été étudié par WHEELER (119) qui utilisait à cet effet un peracide. Mais cet auteur n'avait pu mettre en évidence l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol qui aurait du se former si ce processus réactionnel était identique à celui décrit par KARRER (60) à partir du dibenzoylméthane.

Nous avons repris ces travaux et réussi à isoler cet hydroxy-2 dibenzoylcarbinol après traitement de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane par un peracide.

Par analogie avec ce processus, nous avons tenté d'expliquer le mécanisme de l'hydroxylation réalisée par action du réactif : acide ascorbique, peroxyde d'hyrogène et catalyseur métallique,

2.2. PARTIE EXPERIMENTALE

3.2.I. FORMATION DU FLAVONOL AU COURS DE PROCESSUS RADICALIQUES

3. 2. I. I. Hydroxylation radicalique par voie chimique

A - Techniques utilisées

Le principe de cette technique est identique à celui que nous avons déjà décrit dans la première partie : la flavone est hydroxylée au contact de l'acide ascorbique et d'un agent oxydant, oxygène ou peroxyde d'hydrogène, en présence de sulfate ferreux chélaté à l'EDTA.

L'hydroxylation, réalisée pendant 30 mn sur la flavone (2.10^{-5} mole) dans 100 ml de tampon phosphate de pH 7,5, et l'extraction des produits formés sont effectuées suivant le mode opératoire que nous avons déjà exposé (§ 2.2.I.I.).

La séparation chromatographique des flavones hydroxylées formées, est réalisee à partir du résidu d'évaporation de l'extrait éthéré. Celui-ci, repris par l'acétone, est appliqué sous forme de trait sur le papier Whatman n° 1 préalablement lavé au méthanol.

La séparation sélective de l'hydroxy-3 flavone (flavonol) est effectuée par chromatographie descendante à l'aide du solvant éther de pétrole (Eb 38-60°C) saturé de méthanol à 95°.

Sur le chromatogramme séché à la température ordinaire, repérer la position des flavones hydroxylées sous une lampe UV. Seul, le flavonol se sépare nettement, se distinguant par son spot allongé, de fluorescence jaune-vert, de Rf 0,81. Les autres flavones hydroxylées ont un Rf plus faible (hydroxy-6, 0,15 ; hydroxy-3', 0,13 ; hydroxy-4', 0,05).

Découper le chromatogramme en deux bandes, dont l'une contiendra le flavonol et l'autre l'ensemble des autres flavones hydroxylées.

Eluer dans une cuve chromatographique avec du méthanol pendant douze heures. Les flavones, ainsi recueillies par élution, sont dosées par spectrophométrie. Le dosage du flavonol est effectué à λ correspondant à la bande d'absorption maximale, soit 3440 Å ($\log \varepsilon$ 4,30).

Les autres flavones sont dosées globalement suivant la technique que nous avons déjà décrite(§2.2.I.2.) en se reportant à la courbe étalon établie à 3I00 Å.

On note le rendement global des produits formés ainsi que la fraction de flavonol exprimée en pourcentage.

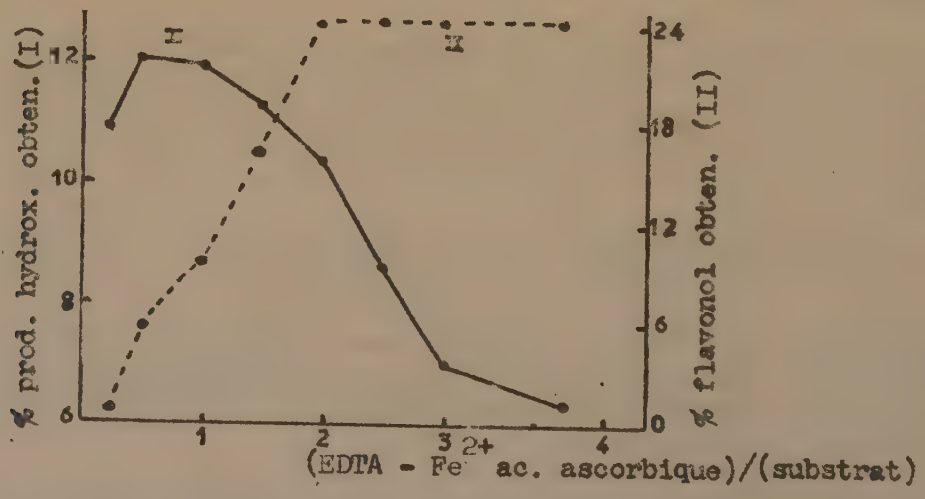
B - Résultats

a - Influence du rapport EDTA-Fe^{2+} acide ascorbique/substrat

Les essais réalisés ont été décrits dans la première partie (tableau 3, essais 55 à 62, fig. 8).

En faisant varier à 75°C le rapport du réactif hydroxylant (EDTA,I ; $FeSO_4$,I; acide ascorbique, 5) au substrat, on trouve entre les valeurs 0,25 à 4, les résultats suivants :

Rapport EDTA-Fer-H_2A/substrat	Rendement global	Flavonol %
0,25	10,9	traces
0,50	12	6
I	11,9	10
1,5	11,2	17
2	10,3	25
2,5	8,6	25
3	7	25
4	6,3	25



I - % Prod. hydrox. obtenu
II - % flavonol obtenu

fig. IO - Influence du rapport (EDTA-Fe^{2+} acide ascorbique)/(substrat)

b - Influence de l'agent oxydant

- Oxygène

. Agitation des solutions en contact avec l'air

Nous venons de montrer que parmi les produits hydroxylés obtenus, 25 % se trouvent à l'état de flavonol lorsqu'on utilise le réactif hydroxylant suivant : EDTA, 4.10^{-5}mole, $FeSO_4$, 4.10^{-5} mole, acide ascorbique 2.10^{-4} mole.

. Barbotage d'oxygène moléculaire

Ce barbotage est réalisé au sein de la solution maintenue à 75°C, les concentrations de réactif étant identiques à celles que nous venons d'utiliser.

Le rendement global en produits formés est de 4%, le pourcentage de flavonol étant de 5 %.

- Peroxyde d'hydrogène

L'action du réactif de Fenton, activé par l'EDTA et l'acide ascorbique, a été étudiée à 75°C ;

- Avec EDTA (4.10^{-5} mole) $FeSO_4$ (4.10^{-5} mole) acide ascorbique (2.10^{-5} mole) et peroxyde d'hydrogène (8.10^{-5} mole) le rendement global est de 3,1 %, le pourcentage de flavonol étant de 8 %.

- En présence des mêmes quantités d'ion ferreux chélaté, mais avec plus d'acide ascorbique - 1.10^{-4} mole, et de peroxyde d'hydrogène - 4.10^{-4} mole, le rendement global n'est que de 2,5 % mais le pourcentage de flavonol obtenu passe à 16 %.

c - Influence de l'acide ascorbique

Après suppression de l'acide ascorbique, l'apparition de flavonol a été étudiée soit en présence de peroxyde d'hydrogène, soit en présence d'oxygène.

- Agitation des solutions en contact avec l'air.

L'hydroxylation est réalisé en présnece d'EDTA, 4.10^{-5} mole de $FeSO_4$, 4.10^{-5} mole, à 75°C.

Le rendement global est de 2 % et on ne trouve pas de flavonol.

- Peroxyde d' hydrogène

Le même quantité d'ion métallique chélaté, est mis en présence à 75°C de peroxyde d'hydrogène, $1,6.10^{-4}$ mole.

Le rendement global est de 2 % et dans ce cas aussi, il n'y a pas formation de flavonol.

d - Influence de la température

La formation de flavonol a été étudiée entre 35 et 80°C à l'aide des quantités de réactif suivantes : EDTA, 4.10^{-5} mole ; $FeSO_4$, 4.10^{-5} mole ; acide ascorbique, 2.10^{-4} mole.

Après agitation pendant 30 mn. des solutions à l'air, on constate que le taux de flavonol augmente avec la température.

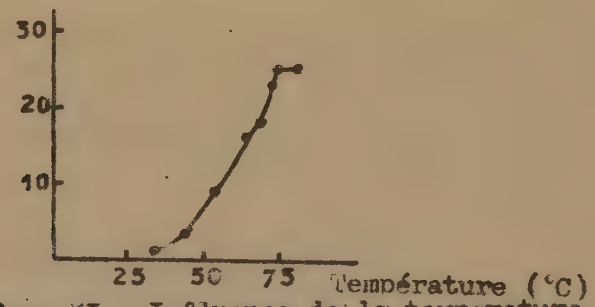


Fig. II - Influence de la température

L'ensemble de nos résultats est rassemblé dans le tableau 4.

Tableau 4

Etude des facteurs conditionnant l'hydroxylation de la flavone en position 3

Substrat : flavone, (2.10^{-5} mole) en solution dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen, 0,067 M, de pH 7,5 en contact avec $FeSO_4$ (4.10^{-5} mole) et EDTA (4.10^{-5} mole)

Durée de la réaction : 30 mn

Essai n°	ac. ascorbique (mole)	Temp. (°C)	Agent d'oxydation	Cond. op. de l'oxygénation	Rdt global (%)	Flavonol (%)
I	2.10^{-4}	75	oxygène (air)	agitation	10,3	25
2	"	"	oxygène pur	barbotage	4	5
3	2.10^{-5}	"	H_2O_2, 8.10^{-5}	contact (air)	3,1	8
4	1.10^{-4}	"	H_2O_2, 4.10^{-4}	"	2,5	16
5	0	"	oxygène (air)	agitation	2	0
6	0	"	H_2O_2, $1,6.10^{-4}$	contact (air)	2	0
7	2.10^{-4}	80	oxygène (air)	agitation	10,2	25
8	"	75	"	"	10,3	25
9	"	72	"	"	10,2	23
10	"	70	"	"	10	18
11	"	65	"	"	9,6	16
12	"	55	"	"	9	9
13	"	45	"	"	8	3
14	"	35	"	"	6,9	traces

3.2.I.2. Hydroxylation radicalique par voie radiochimique

Nous avons envisagé l'action du radical libre hydroxyle formé par radiolyse de l'eau.

La flavone (2.10^{-5} mole), est dissoute à l'ébullition dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen 0,067 M, de pH 7,5. Après refroidissement de la solution, celle-ci est soumise, à la température ambiante, à l'action des rayons γ émis par du ^{60}Co, la dose absorbée étant de 40 000 rads. *

Après irradiation, la solution est acidifiée, les produits formés et le substrat sont extraits du milieu réactionnel, séparés et dosés suivant le mode opératoire que nous avons décrit (§ 2.2.I.I.).

Les résultats sont identiques à ceux obtenus à l'aide des systèmes chimiques producteurs du radical libre hydroxyle (système de Fenton ou Udenfriend) mais le rendement global est plus faible, 0,5 %.

Il ne se forme pas de flavonol.

---

* Ces essais ont été réalisés à l'aide de la bombe au ^{60}Co du Centre Léon-Bernard à Lyon. Nous tenons à remercier ici M. Le Pr. PAPILLON, Chef du Service et M. le Dr DUTOU qui nous ont permis d'effectuer ces essais.

3.2.2. FORMATION DU FLAVONOL APRES INHIBITION DU PROCESSUS RADICALIQUE

3.2.2.I. Suppression des ions métalliques

La formation du radical libre hydroxyle étant induite par l'oxydation de l'ion métallique, on pouvait penser que la genèse de ce radical serait inhibée par la suppression de l'ion ferreux chélaté dans le réactif hydroxylant.

Afin d'éviter l'influence des ions métalliques en solution à l'état de traces dans le tampon phosphate, nous avons ajouté au milieu réactionnel certains inhibiteurs de l'oxydation de ces ions, tels l'azoture de sodium ou le cyanure de potassium.

Le mode opératoire a été le suivant :

L'acide ascorbique (4.10^{-4} mole) et du cyanure de potassium (5 mg) en solution dans 10 ml d'eau bidistillée, sont ajoutés à 100 ml de tampon phosphate de pH 7,5, contenant en solution 2.10^{-5} mole de flavone à 75°C. Après homogénéisation, la solution est additionnée de peroxyde d'hydrogène ($1,6.10^{-4}$ mole). Après 30 mn de contact, la réaction est arrêtée par acidification. La suite des opérations est identique à celle que nous avons déjà exposée dans cette partie (§ 3.2.I.I. - A).

Le rendement global est de 0,8 % mais on trouve du flavonol en proportions relativement plus importantes (50 %).

Ainsi l'inhibition du mécanisme radicalique n'est pas parfaite.

3. 2. 2. 2. Addition d'un solvant organique

Nous avons déjà montré qu'un solvant organique, en excès par rapport au substrat en solution dans le milieu réactionnel, subit par phénomène compétitif une attaque préférentielle du radical libre hydroxyle. Lorsque cette addition a lieu dans un milieu réactionnel ne contenant plus d'ions ferreux, l'hydroxylation de la flavone par processus radicalique doit être totalement inhibée.

La flavone (2.10^{-5} mole), est dissoute dans 10 ml de diméthylformamide. L'acide ascorbique ($I.10^{-4}$ mole) en solution dans 5 ml d'eau bidistillée puis le peroxyde d'hydrogène (4.10^{-4} mole) sont ajoutés. Après avoir été amenée au pH désiré, cette solutinn est maintenue 30 mn à 75°C. La réaction étant arrêtée par acidification jusqu'à pH I, la solution est diluée par 50 ml d'eau distillée et les produits formés ainsi que le substrat extraits par l'éther. La séparation, l'isolement et le dosage de ces produits sont réalisés suivant le processus expérimental déjà exposé dans cette partie (§ 3.2.I.I. - A).

Une première expérience, réalisé à pH 7,5, montre, lors de l'étude chromatographique des produits formés, l'obtention de flavonol (Rdt 0,5 %) et d'une autre substance, de Rf 0,93 dans le solvant éther de pétrole (38-60°C) saturé de méthanol à 95°, révélée par sa fluorescence brun-jaune aux UV et par sa coloration brun rouge lors de la pulvérisation d'une solution alcoolique de perchlorure de fer à 1 % sur le chromatogramme.

Dans ces conditions, on ne retrouve plus les flavones hydroxylées, qui étaient obtenues par action du radical libre hydroxyle selon un processus chimique ou physique.

La même expérience, réalisée à pH 12, montre que seule, se forme cette nouvelle substance.

3.2.3. OBTENTION DE L'HYDROXY-2 DIBENZOYLMETHANE

3.2.3.I. A partir de la flavone

Nous avons constaté que le simple chauffage de la flavone en milieu alcalin sans addition d'acide ascorbique ou de peroxyde d'hydrogène, permettait d'obtenir cette substance.

Le mode opératoire est le suivant :

La flavone (40 mg) est dissoute dans 5 ml de diméthylformamide. Dans cette solution portée à l'ébullition, de la potasse méthylique à 4 % (0,3 ml) est ajoutée. L'ébullition est maintenue pendant 1 mn. La réaction est arrêtée par acidifications. Après dilution par 50 ml d'eau distillée, il se forme un précipité abondant.

Après extraction par l'éther, puis lavage par de l'eau saturée de carbonate acide de sodium, les produits phénoliques sont isolés de la phase éthérée par une solution aqueuse d'hydroxydé de sodium N.

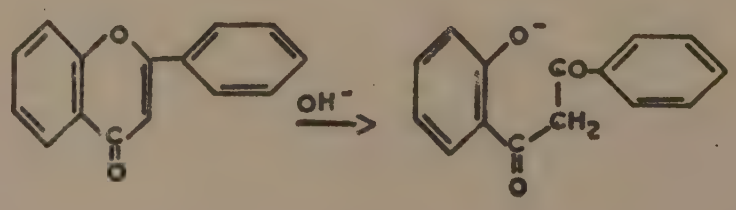
A partir de cette phase aqueuse acidifiée, le produit obtenu est isolé par extraction à l'éther qui est ensuite évaporé .

On obtient ainsi 20 mg de cette substance qui est recristallisée dans l'éthanol à 60°. (Rdt ≠≠ 60 %).

F : 118°C.

Cristaux jaunes, solubles dans l'éthanol, l'acétone, l'acide acétique, insolubles dans l'eau.

Ce F est identique à celui de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane, classiquement obtenu par ouverture du cycle flavonique sous l'influence d'agents alcalins.



Nous avons pu nous assurer qu'il s'agissait bien de cette substance par le non abaissement du F par mélange avec un échantillon témoin et par l'étude comparative chromatographique de ce produit avec un témoin.

3.2.3.2. Par synthèse

Préparation de l'o-hydroxy acétophénone

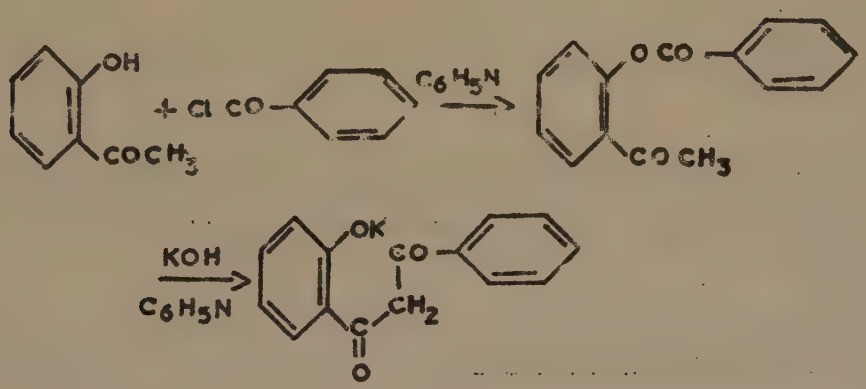
Méthode décrite dans Organic Syntheses (82) à propos de l'o-hydroxy propiophénone . Sur l'acétate de phényle, on réalise une transposition de Fries à l'aide de trichlorure d'aluminium.

Les isomères ortho et para sont séparés par distillation fractionnée.

o-hydroxy acétophénone, Eb_{20mm} = 105 - 106°, Rdt = 30 %

Préparation de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane(120)

Après condensation dans la pyridine de l'o-hydroxy acétophénone avec du chlorure de benzoyle, l'o-benzoyloxyacétophénone obtenue subit par action de la potasse une transposition intra moléculaire de Claisen (88). Il se forme ainsi de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane (technique de BAKER (6) et VENKATARAMAN (71).



Cristaux jaunes, F 118° C (Litt. 118°C(120)).

3.2.4. SYNTHESE DU FLAVONOL A PARTIR DE L'HYDROXY-2 DIBENZOYLMETHANE

Etude du réactif hydroxylant : acide ascorbique - peroxyde d'hydrogène

Nous avons examiné en premier lieu le comportement de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane traité par le réactif d'UDENFRIEND modifié.

Ce substrat, (2.10^{-5} mole), est dissous à l'ébullition dans 100 ml de tampon phosphate de Soerensen 0,067 M, de pH 7,5.

Le réactif hydroxylant est préparé extemporanément par dissolution dans 10ml d'eau bidistillée de sulfate ferreux, 4.10^{-5} mole, d'EDTA, 4.10^{-5} mole, d'acide ascorbique, 2.10^{-4} mole.

La β dicétone en solution, ajoutée à ce réactif, est portée au B-M à 75°C. Une agitation mécanique (1500 t/mn) est réalisé dans cette solution en contact avec l'air pendant 30 mn.

L'extraction, la séparation chromatographique et le dosage des produits formés sont effectués suivant le mode opératoire décrit au § (3.2.I.I.-A). Dans ces conditions, on obtient à la fois du flavonol et des flavones hydroxylées principalement sur le noyau phényle latéral (tableau I). Le rendement global est de 2 %, le pourcentage de flavonol étant de 40 %.

Par contre, si, après avoir supprimé l'ion ferreux chélaté dans le réactif hydroxylant, on réalise cette hydroxylation dans le diméthylformamide seulement en présence d'acide ascorbique et de peroxyde d'hydrogène, il ne se forme alors plus que du flavonol.

3.2.4.I. Rendement de la réaction

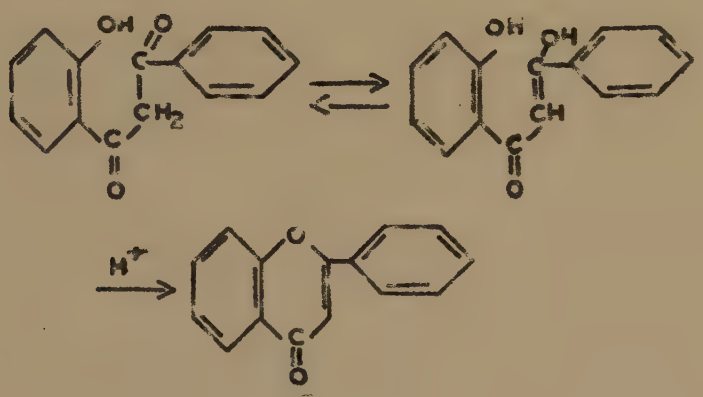
A - Techniques utilisées

La formation de flavonol a été étudiée à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane dissous dans le diméthylformamide, mis au contact de l'agent oxydant et de l'acide ascorbique en phase aqueuse. La solution est maintenue pendant un temps déterminé à la température fixée. La réaction est arrêtée par acidification. Après dilution par de l'eau, le substrat et les produits formés sont extraits par un solvant organique.

Le flavonol et l'hydroxy-2 dibenzoylméthane sont tous deux solubles en milieu alcalin. La séparation directe de ces deux composés ne pouvait donc être envisagée par leur extraction de la phase éthérée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium.

Mais lorsque le mélange de ces deux substances est traité par de l'acide sulfurique concentré, seul le flavonol demeure inchangé. L'hydroxy-2 dibenzoylméthane

se recyclise en flavone. La séparation ultérieure de ces deux dérivés pourra donc s'effectuer à l'aide de leur solubilité différentielle au milieu alcalin.



Le mode opératoire a été le suivant :

l'hydroxy-2 dibenzoylméthane (2.10^{-5} mole) est dissous dans 5 ml de diméthylformamide. L'acide ascorbique, en solution dans 2 ml d'eau bidistillée, est ajouté. Amener au pH désiré et additionner de peroxyde d'hydrogène.

Après un temps variable au B-M à la température fixée pour l'expérience, et après addition jusqu'à pH I d'acide chlorhydrique à 20 %, la solution est diluée avec 80 ml d'eau distillée. Le substrat et les produits formés sont extraits par l'éther éthylique. Les produits acides sont éliminés par lavage à l'eau saturée de carbonate acide de sodium.

Le résidu d'évaporation de la phase éthérée est repris par de l'acide sulfurique concentré.

Cette solution sulfurique brun-jaune est diluée dans un grand volume d'eau ; il se forme un précipité, mélange de flavone et de flavonol extraits à nouveau par de l'éther. Après lavage de la phase éthérée à l'eau, puis à l'eau saturée de carbonate acide de sodium, le flavonol est isolé sélectivement par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N. La phase éthérée ne contenant plus que la flavone est évaporée. La phase aqueuse alcaline est acidifiée et le flavonol est extrait par l'éther qui est évaporé.

Les résidus d'évaporation de ces deux extraits éthérés, contenant l'un la flavone, l'autre le flavonol, sont dissous dans du méthanol.

Le dosage spectrophotométrique de ces deux éléments est alors effectué aux λ correspondant aux bandes d'absorption maximales de ces deux composés (Flavone ; 2975 Å, log ε 4,20 ; flavonol : 3440 Å, log ε 4,30.)

TABLEAU 5

Facteurs conditionnant la synthèse du flavonol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane

Substrat : hydroxy-2 dibenzoylméthane, (4.10^{-5} mole) en solution dans 5 ml de diméthyl formamide et 2 ml d'eau bidistillée.

Essai (n°)	pH	Température (°C)	Ac. ascorbique (mole)	H_2O_2 (mole)	Durée (mn.)	Rendt. flavonol (%)	Substrat non attaqué (%) (exprimé en flavone)
1	1	90	$1,6.10^{-4}$	8.10^{-5}	30	0,8	70
2	2	-	-	-	-	2	62
3	3	-	-	-	-	2,8	58
4	3,5	-	-	-	-	4,5	54
5	4	-	-	-	-	6,6	54
6	4,5	-	-	-	-	6,3	54
7	5	-	-	-	-	6	52
8	6	-	-	-	-	3,7	38
9	7	-	-	-	-	2,2	30
10	8	-	-	-	-	1,5	12
11	4	25	$1,6.10^{-4}$	8.10^{-5}	30	0,4	76
12	-	50	-	-	-	1,2	70
13	-	60	-	-	-	2	66
14	-	65	-	-	-	4,6	62
15	-	70	-	-	-	5,7	59
16	-	75	-	-	-	6,5	57
17	-	80	-	-	-	6,7	54
18	-	100	-	-	-	6,7	45
19	-	125	-	-	-	6,6	40
20	4	80	0	8.10^{-5}	30	1,5	70
21	-	-	4.10^{-5}	-	-	3	61
22	-	-	8.10^{-5}	-	-	4,5	59
23	-	-	$1,6.10^{-4}$	-	-	6,7	54
24	-	-	$2,4.10^{-4}$	-	-	6,7	53
25	-	-	$3,2.10^{-4}$	-	-	6,7	54
26	-	-	$6,4.10^{-4}$	-	-	5,4	38
27	4	80	4.10^{-5}	2.10^{-5}	30	3,3	70
28	-	-	8.10^{-5}	4.10^{-5}	-	4,7	61
29	-	-	$1,6.10^{-4}$	8.10^{-5}	-	6,7	57
30	-	-	$2,4.10^{-4}$	$1,2.10^{-4}$	-	7,2	50
31	-	-	$3,2.10^{-4}$	$1,6.10^{-4}$	-	6,6	53
32	-	-	$6,4.10^{-4}$	$3,2.10^{-4}$	-	5	50
33	4	80	$2,4.10^{-4}$	$1,2.10^{-4}$	30	7,2	50
34	-	-	-	-	60	7,8	46
35	-	-	-	-	120	8,7	41
36	-	-	-	-	180	8,5	35
37	-	-	-	-	240	8,4	30
38	4	80	$2,4.10^{-4}$	$1,2.10^{-4}$	Agitation des sol. en contact avec l'air 15	5	67
39	-	-	-	-	20	6,5	60
40	-	-	-	-	30	7,7	50
41	-	-	-	-	45	9,2	50
42	-	-	-	-	60	9,6	50
43	-	-	-	-	90	9,6	45
					120	9,6	40

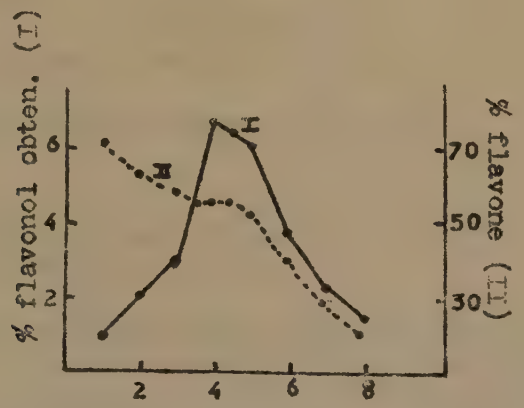
B - Résultats

a - Influence du pH

Cette étude a été réalisée pour des valeurs de pH situées entre I et 8, avec des concentrations en acide ascorbique et en peroxyde d'hydrogène respectivement de $1,6.10^{-4}$ mole et de 8.10^{-5} mole.

La réaction a été poursuivie pendant 30 mn. à 90ºC.

Le pH optimal trouvé est de 4.



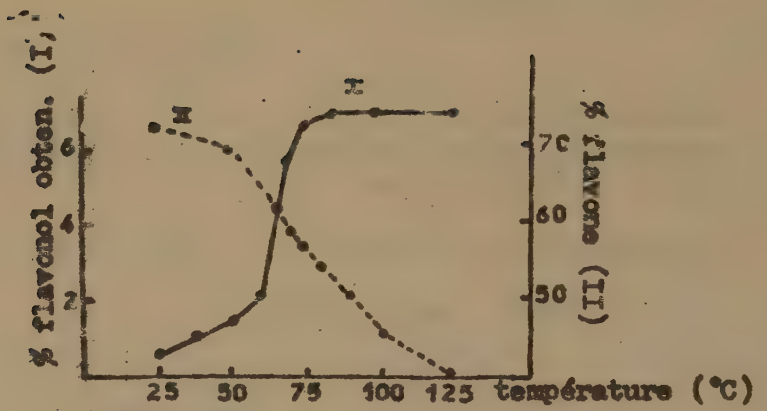
I - % flavonol obtenu
II - % substrat résiduel (exprimé en flavone)

fig 12. Influence du pH

b. Influence de la température

A pH 4, le rendement de la réaction a été étudié entre des températures de 25 à 125ºC, avec des quantités de réactif hydroxylant identiques à celles utilisées dans l'expérience précédente pendant 30 mn.

La quantité de flavonol formé augmente fortement à partir de 65ºC pour se stabiliser ensuite à 80ºC.



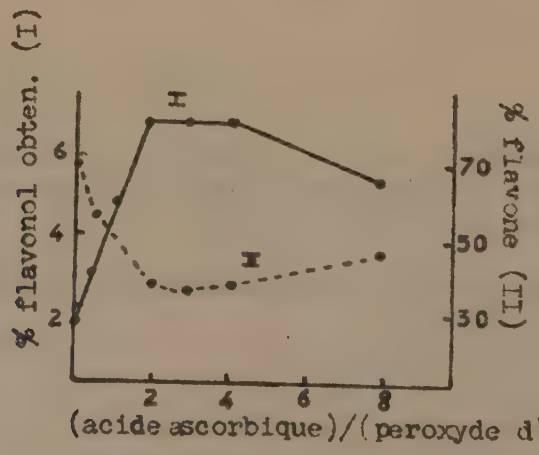
I - % flavonol
II - % substrat résiduel (exprimé en flavone)

fig. I3 - Influence de la température

c - Valeur du rapport acide ascorbique/ peroxyde d'hydrogène

A 80°C, pour un taux de peroxyde d'hydrogène fixe (8.10^{-5} mole), la quantité d'acide ascorbique varie de 0 à $6,4.10^{-4}$ mole à pH 4.

Le rendement est optimal à partir d'une valeur du rapport acide ascorbique/ peroxyde d'hydrogène égale à 2.



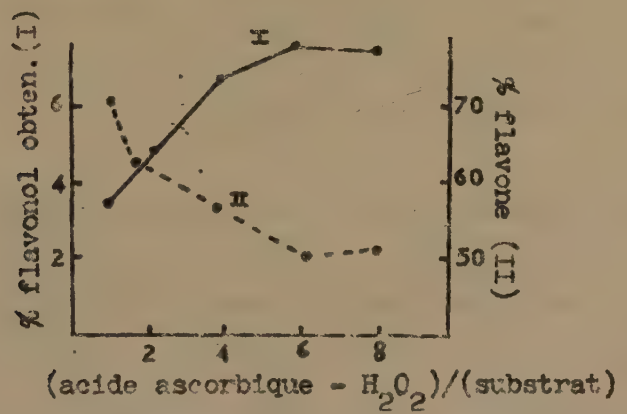
I - % flavonol
II - % substrat résiduel (exprimé en flavone)

fig. I4 - Influence du rapport acide ascorbique/peroxyde d'hydrogène

d - Valeur du rapport acide ascorbique peroxyde d'hydrogène/substrat

Tout le réactif hydroxylant, maintenu dans un rapport constant (acide ascorbique ,2, peroxyde d'hydrogène ,I,) varie, la concentration du substrat étant maintenue fixe, à pH 4 et à 80°C.

Ce rapport est optimal pour une valeur de 6 (base du calcul : rapport acide ascorbique/substrat)



I - % flavonol
II - % substrat résiduel (exprimé en flavone)

fig. I5 - Influence du rapport acide ascorbique peroxyde d'hydrogène/substrat

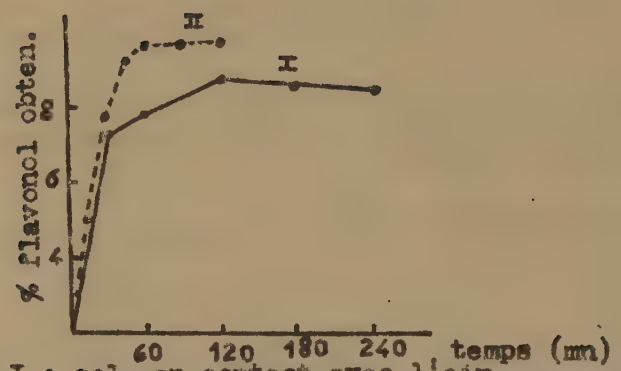
e - Cinétique de la réaction

- Solutions en contact avec l'air

Avec acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) et peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole), à pH 4 et à 80°C, le rendement est optimal en 120 mn.

- Agitation de la solution en contact avec l'air

La même opération est réalisée avec agitation mécanique de la solution (1500 t/mn). Le rendement est légèrement augmenté en un temps optimal de 60 mn.



I : sol. en contact avec l'air
II : agitation de ces solutions

fig. 16 - Cinétique de la réaction

L'ensemble des résultats exposé dans ce § est rassemblé dans le tableau 5.

f - Influence de chacun des constituants du réactif sur la synthèse du flavonol

- Peroxyde d'hydrogène

L'addition de peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole chaque fois) est effectuée toutes les 60 mn. dans la solution contenant le substrat et le réactif hydroxylant (acide ascorbique, $2,4.10^{-4}$ mole ; peroxyde d'hydrogène, $1,2.10^{-4}$ mole).

Une agitation mécanique (1500 t/mn) est réalisée dans cette solution en contact avec l'air, à pH 4 et à 80°C.

Dans ces conditions, l'élévation du taux de flavonol est faible après 60 mn. Après 120 mn, le rendement en flavonol baisse accompagné d'une diminution importante du substrat.

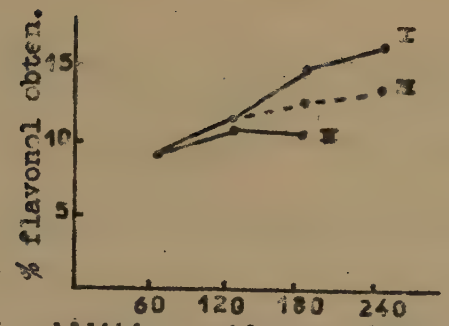
- Acide ascorbique

Dans les mêmes conditions, l'addition d'acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) toutes les 60 mn. entraîne une augmentation plus marquée du rendement en flavonol.

- Acide ascorbique et peroxyde d'hydrogène

L'addition toutes les 60 mn d'acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) et de peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole) montre une élévation plus nette du rendement.

Mais dans ce cas aussi, cette augmentation n'est pas linéaire et il subsiste encore une quantité importante de substrat non attaqué.



I - Addition acide ascorbique + H_2O_2

II - Addition acide ascorbique

III - Addition H_2O_2

fig. 17 - Influence de chacun des constituants du réactif sur la synthèse flavonol

Addition à intervalle de 60 mn de	Rdt en flavonol %	Substrat non attaqué % (exprimé en flavone)
Peroxyde d'hydrogène, 1,2.10^{-4} mole	11 10,4	35 30
Acide ascorbique, 2,4.10^{-4} mole	11,8 12,4 13,2	45 40 35
Peroxyde d'hydrogène, 1,2.10^{-4} mole + Acide ascorbique, 2,4.10^{-4} mole	11,8 14,4 16,4	43 35 30

3.2.4.2. Mécanisme de la réaction ; rôle de chacun des constituants du réactif

La conduite de l'hydroxylation, réalisée à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane (4.10-5 mole) en solution dans 5 ml de diméthylformamide, varie selon les essais envisagés, mais l'isolement, la séparation et le dosage des produits formés sont identiques à ceux décrits au § IV-A. L'étude chromatographique des produits formés à été effectuée à l'aide du solvant éther de pétrole saturé de méthanol à 95°C suivant le mode opératoire que nous avons déjà exposé.

A - Rôle du peroxyde d'hydrogène

a - A pH 4

L'expérience est décrite au § (3.2.4.I. - B,c) le rendement en flavonol n'est que de 1,5 %.

b - A pH 12

Le peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole) est ajouté à la solution amenée à pH 12 et additionnée de 2 ml d'eau distillée.

La réaction a été effectuée à 3°C pendant 15 heures et à 80°C pendant 30 mn.

Dans les deux cas, il ne s'est pas formé de flavonol.

Seuls, ont été obtenus des produits de dégradation, acide benzoïque et o-hydroxy acétophénone.

B - Role de l'acide ascorbique

La solution est additionnée d'acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) en solution dans 2 ml d'eau distillée, amenée au pH désiré et maintenue à 80°C pendant 30 mn.

a - A pH 4

- Par agitation de la solution à l'air, le rendement en flavonol est de 2,5 %
- Par barbotage d'oxygène moléculaire au sein de la solution, le rendement en flavonol est de 3,5 %.

b - A pH 12

Dans les mêmes conditions, il ne se forme pas de flavonol.

C - Influence des ions métalliques

a - Addition de Cu^{2+}

La solution d'hydroxy-2 dibenzoylméthane est additionnée de 2 ml d'une solution aqueuse contenant de l'acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) et du sulfate cuivrique (1 mg). Le pH ayant été amené à 4, le peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole) est ajouté.

Après 30 mn. à 80°C, le rendement en flavonol n'est que de 1,5 %. Dans les mêmes conditions, sans addition de Cu^{2+}, le rendement est de 7,2 % (essai 30 tableau 5).

b - Addition d'EDTA

Le mode opératoire étant identique à celui qui vient d'être décrit, de l'EDTA (5 mg) est ajouté au lieu de l'ion Cu^{2+}.

Le rendement en flavonol n'est plus que de 1 %.

D- Rôle de l'eau

L'acide ascorbique ($2,4.10^{-4}$ mole) est dissous dans le diméthylformamide (5 ml) en présence du substrat et du peroxyde d'hydrogène ($1,2.10^{-4}$ mole). A 80°C, et après 30 mn, à pH 4, le rendement en flavonol n'est que de 1 %.

D'après ces premiers résultats, il ne semble pas que le flavonol puisse se former à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane par un seul processus radicalique.

Cependant, la preuve formelle d'un mécanisme ionique ne pouvait être apportée qu'après avoir réalisé une réaction identique à l'aide d'un réactif électrophile classique.

Nous avons ainsi été amenés à étudier l'action d'un peracide sur l'hydroxy-2 dibenzoylméthane.

3.2.5. COMPORTEMENT DE L'HYDROXY-2 DIBENZOYLMETHANE SOUS L'INFLUENCE D'UN PERACIDE

3.2.5.1. Etude des conditions optimales de la réaction

L'hydroxy-2 dibenzoylméthane, (8.10^{-5} mole) est dissous dans 5 ml d'acide acétique. Du peroxyde d'hydrogène * est ajouté. La solution est laissée au B-M pendant un temps déterminé à la température fixée pour l'expérience au contact du peracide qui se forme extemporanément. De l'eau distillée (45 ml) est ajoutée. Le substrat et les produits formés, ainsi précipités, sont extraits par de l'éther éthylique. Ce dernier est lavé par une solution saturée de carbonate acide de sodium qui élimine les produits acides.

La phase éthérée est évaporée. Le résidu huileux formé n'est pas du flavonol. Celui-ci n'est obtenu qu'après reprise sulfurique de ce résidu. La solution sulfurique obtenue est diluée dans de l'eau et le mélange de flavone et de flavonol ainsi précipité extrait par l'éther. Après lavage de cette phase éthérée à l'eau, puis à l'eau saturée de carbonate acide de sodium, le flavonol est isolé par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N.

La phase éthérée ne contenant plus que la flavone est évaporée. La phase aqueuse alcaline est acidifiée et le flavonol est extrait par l'éther qui est évaporé. Les résidus d'évaporation de ces deux extraits éthérés, contenant l'un la flavone, l'autre le flavonol, sont dissous dans du méthanol.

Le dosage spectrophotométrique de la flavone à 2975 Å (log ε 4,20) et du flavonol à 3440 Å (log ε 4,30) est alors effectué.

L'identification du corps intermédiaire formé lors de cette synthèse, est exposée après l'étude des facteurs conditionnant une telle réaction.

A - Influence du rapport peroxyde d'hydrogène/substrat

La quantité de peroxyde d'hydrogène varie de 8.10^{-5} à $6,4.10^{-4}$ mole. A 50°C, et après un temps de réaction de 15 heures, le rendement optimal (26 %) est obtenu pour un rapport peroxyde d'hydrogène/substrat de 6.

B - Influence de l'acide formique

La solution acétique est additionnée d'acide formique (1,6 à $4,8.10^{-3}$ mole), puis de peroxyde d'hydrogène, $4,8.10^{-4}$ mole. L'acide performique ainsi formé en 15 heures et à 50°C, donne pour une quantité d'acide formique de $2,4.10^{-3}$ mole, un rendement optimal de 40 %.

---

* Eau oxygénée PROLABO, 110 vol. "Electro", pour analyses.

C - Influence de la température

Après 15 heures, la réaction est optimale à 50°C avec des quantités de peroxyde d'hydrogène et d'acide formique respectivement de $4,8.10^{-4}$ mole et de $2,4.10^{-3}$ mole.

D - Cinétique de la réaction

A 50°C, avec des quantités optimales de peroxyde d'hydrogène ($4,8.10^{-4}$ mole) et d'acide formique ($2,4.10^{-3}$ mole) un rendement de 55 % en flavonol est obtenu après un temps de réaction de 5 heures. Lorsque la réaction est poursuivie, le rendement baisse.

L'ensemble de ces résultats est rassemblé dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Substrat : hydroxy-2 dibenzoylméthane, (8.10^{-5} mole) en solution dans 5 ml d'acide acétique.

Essai n°	H_2O_2 (mole)	acide formique (mole)	Temp. (°C)	Durée (heures)	Rendt flavonol (%)
I	8.10^{-5}	0	50	15	7
2	16 "	-	-	-	13
3	32 "	-	-	-	20
4	48 "	-	-	-	26
5	64 "	-	-	-	26
6	$4,8.10^{-4}$	$1,6.10^{-3}$	50	15	36
7	-	2,4 "	-	-	40
8	-	3,2 "	-	-	40
9	-	4,8 "	-	-	40
10	$4,8.10^{-4}$	$2,4.10^{-3}$	20	15	20
11	-	-	30	-	25
12	-	-	40	-	35
13	-	-	45	-	37
14	-	-	50	-	40
15	-	-	55	-	38
16	-	-	60	-	35
17	-	-	70	-	30
18	$4,8.10^{-4}$	$2,4.10^{-3}$	50	1	8
19	-	-	-	2	15
20	-	-	-	3	30
21	-	-	-	4	45
22	-	-	-	5	55
23	-	-	-	7	55
24	-	-	-	9	50
25	-	-	-	15	40

3.2.5.2. Identification de l'intermédiaire formé lors de la synthèse du flavonol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane traité par un peracide.

A - Préparation

Suivant les quantités optimales définies au § précédent, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane, 0,025 mole, est dissous dans 500 ml d'acide acétique glacial. De l'acide formique -0,75 mole- et du peroxyde d'hydrogène -0,15 mole - sont ajoutés à cette solution qui est portée au B-M à 50°C pendant 5 heures. La solutinn est diluée au 1/10 par de l'eau distillée. Il se forme un léger précipité, mélange de flavonol et de produits de dégradation. Filtrer. Les produits formés sont extraits du filtrat par de l'éther. Cette phase éthérée est lavée par une solution aqueuse saturée de carbonate acide de sodium jusqu'à disparition de l'acidité, par de l'eau distillée puis séchée sur sulfate de sodium anhydre.

Après évaporation, il se forme un résidu huileux jaune-vert dans lequel apparaissent quelques cristaux blancs.

Reprise dans le mélange éther de pétrole (E 38-60°C) - chloroforme (95:5) ou dans la ligroïne (E 60-90°C), solvants permettant une bonne recristallisation de de cet ensemble.

Rendement : 52 %
Cristaux blancs, F : 104°C
très solubles dans l'alcool, l'éther, l'acide acétique.

Spectre UV (méthanol) : λ max 2520 (logε 4,01) et 3200 Å (3,56)
Analyse : trouvé % : C,70,27 H, 4,83

Benzoylation

Cette substance (## 0,01 mole),est dissoute dans 20 ml de pyridine anhydre fraîchement distillée. Du chlorure de benzoyle, - 0,03 mole - est ajouté à cette solution. La réaction est exothermique et il se forme un abondant précipité blanc. Lorsque le dégagement de chaleur est achevé (45 mn), porter l'ensemble en agitant dans 500 ml d'eau glacée contenant 2 % d'acide chlorhydrique.

Il se forme un précipité qui est séparé par filtration, lavé par 5 ml de méthanol puis par 5 ml d'eau distillée.

Le précipité est séché à la température ordinaire et recristallisé dans du méthanol.

Rendement quantitatif : F 159°
Analyse : trouvé % : C,75,56 H, 4,05

B - Propriétés

Cette substance se caractérise par une très grande instabilité.

I - Transformations en milieu neutre

Ce corps (100 mg) est dissous à l'ébullition dans de l'eau. Par refroidissement, il se forme un précipité.

Les produits formés sont extraits du milieu acidifié à pH I, par de l'éther qui est ensuite évaporé. Ils sont identifiés par chromatographie à partir de ce résidu d'évaporation.

La présence d'acide salicylique a pu ainsi être caractérisée à l'aide du solvant n-butanol saturé par une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium 1,5 N par chromatographie ascendante sur papier Arches 302. L'acide salicylique, révélé par pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 1 %, a un Rf de 0,65.

A l'aide du solvant éther de pétrole (E 38-60°C) saturé de méthanol à 95°, nous avons pu caractériser du flavonol (environ 10 %) suivant la technique que nous avons déjà décrite.

2 - Transformations en milieu acide

Cette substance est dissoute dans l'acide sulfurique froid. La solution brun-jaune est versée dans l'eau. Il se forme un précipité jaune clair qui est filtré et lavé à l'eau, puis recristallisé dans l'éthanol à 60°. Rendement : 85 %, Aiguilles blanc-jaunâtre, F 160°C, identique au flavonol.

Le non abaissement du F par mélange avec un échantillon témoin, les études comparatives, spectrales et chromatographiques, montrent qu'il s'agit du flavonol.

3- Transformations en milieu alcalin

a/ Influence du carbonate acide de sodium. 100 mg de cette substance sont dissous dans 2 ml de méthanol et additionnés de 2 ml d'une solution aqueuse saturée de carbonate acide de sodium. Une coloration rouge-orangé apparait et il se dégage de cette solution une odeur aromatique.

La solution est diluée par 10 ml d'eau distillée jusqu'à pH I. Les produits formés sont extraits par de l'éther qui est ensuite évaporé.

Leur identification est réalisée à partir de ce résidu d'évaporation suivant la technique que nous venons d'exposer (A-I).

Nous avons pu caractériser de l'acide salycilique (20 % environ) et des traces de flavonol. Il semble qu'il y ait encore une autre substance que nous n'avons pas réussi à isoler.

b/ Influence de l'hydroxyde de sodium. Le corps intermédiaire étudié, traité par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N, est entièrement dégradé après 3 mn d'ébullition.

Nous n'avons pu identifier que de l'acide salicylique.

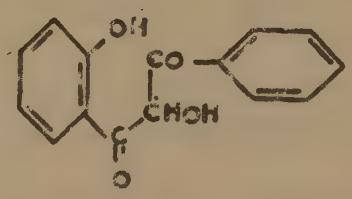
4 - Influence de la chaleur

Par distillation sous pression réduite, nous avons pu isoler du flavonol E_{2mm} = 190 - 200°C

Rdt : 20 %
F : 160°C, après recristallisation dans l'éthanol à 60°.

C - Structure

KARRER (60) a montré que le dibenzoylméthane, traité par un peracide, se transforme en dibenzoylcarbinol. Il est donc logique de s'attendre à obtenir par le même traitement de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane.



Les éléments en faveur d'une telle structure sont les suivants :

- mode de préparation identique dans son principe à celui de KARRER

- données analytiques :

Hydroxy-2 dibenzoylcarbinol, $C_{15}H_{12}O_4$, Calc % : C , 70,30 H , 4,72
tr : C , 70,27 H , 4,83

Hydroxy-2 dibenzoylcarbinol après benzoylation :

dérivé dibenzoylé : $C_{29}H_{20}O_6$, Calc % : C , 74,99, H , 4,34
tr : C , 75,56 H , 4,05

- spectre UV : d'après l'étude de KARRER, les dibenzoylcarbinols présentent deux bandes d'absorption d'importance inégale, la plus forte située à λ voisine de 2500 Å, l'autre plus faible à λ située au dessus de 3000 Å, L'importance de cette dernière bande d'absorption est proportionnelle au degré d'énolisation que peuvent revêtir ces molécules dicétoniques. Ainsi le dibenzoylcarbinol, faiblement énolisé, présente le spectre UV suivant : λ max (éthanol) : 2420 (log ε 4,5) et 3300 Å (log ε 2,4).

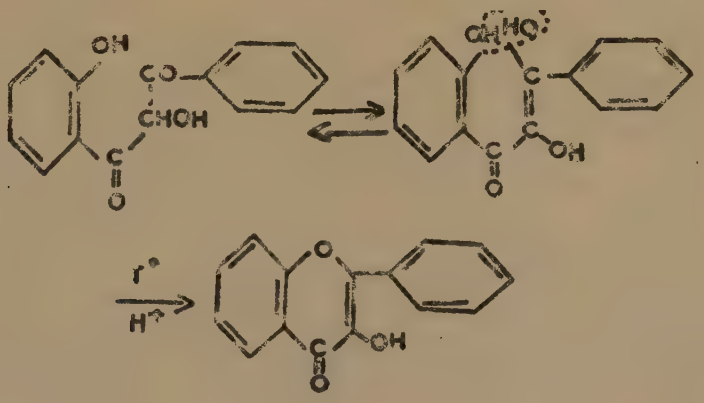
De même, l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol présente une forte bande d'absorption à 2520 Å (log ε 4,01) et une seconde moins importante, à 3200 Å (log ε 3,56) (voir fig. 18).

- instabilité en milieu alcalin : KARRER a montré que le dibenzoylcarbinol est très instable en milieu alcalin. En présence de carbonate acide de sodium à

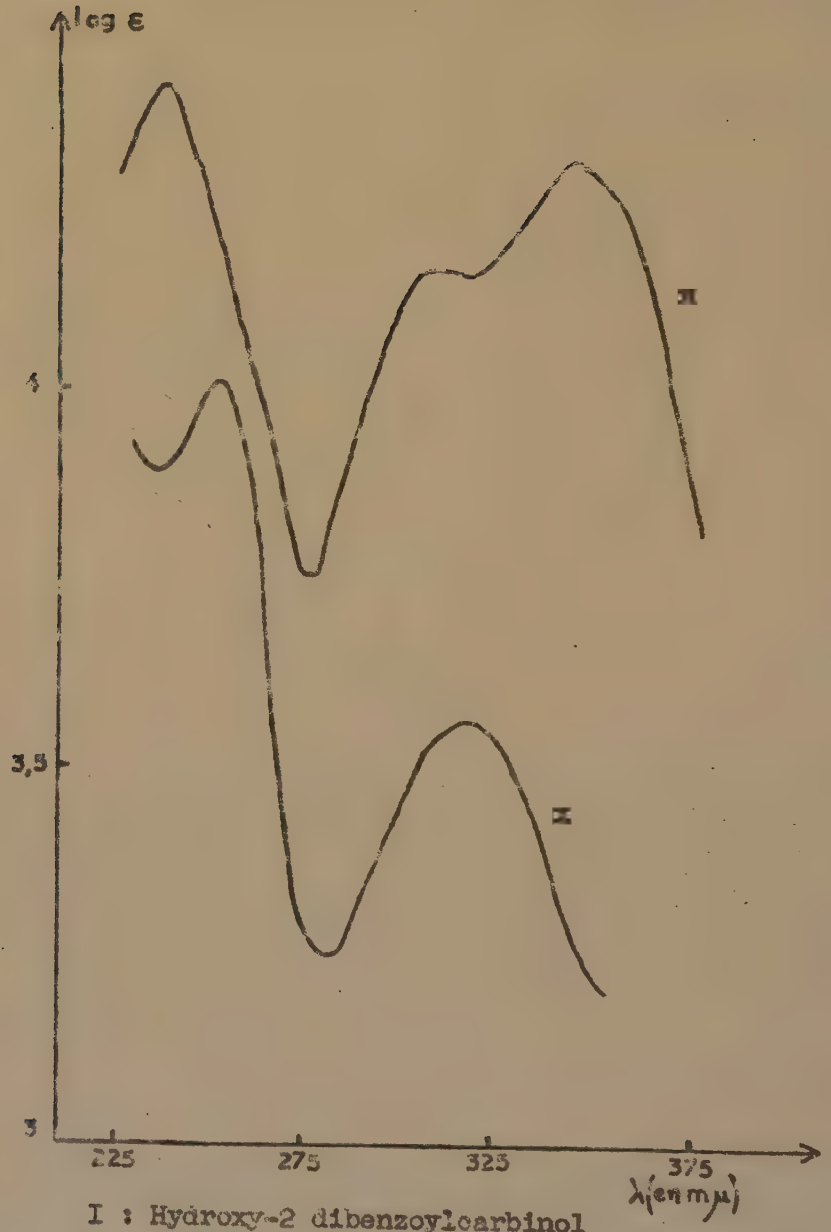
froid, il s'isomérise en benzoate de benzoylcarbinol alors qu'en présence d'hydroxyde de sodium, la dégradation est immédiate et il se forme de l'acide benzoïque.

Nous avons retrouvé les mêmes propriétés à partir de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol (isolement dans ce cas de l'acide o-hydroxy benzoïque) mais nous n'avons pas réussi à isoler le benzoate de l'hydroxy-2 benzoylcarbinol.

- la présence d'un groupement hydroxyle en position 2 provoque une recyclisation facile de cette molécule soit sous l'influence d'un acide soit par chauffage : il se forme du flavonol.



Il semble qu'il faille rattacher à cette facile recyclisation, le fait que WHEELER (119) n'ait pu isoler que du flavonol en faisant agir de l'acide perbenzoïque sur l'hydroxy-2 dibenzoylméthane en solution dans du chloroforme. Cet auteur en effet évapore sous vide le solvant à la fin de l'opération. L'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol qui peut se former au cours de la réaction, se trouve alors en présence du peracide pur et doit alors se recycliser en flavonol.



I : Hydroxy-2 dibenzoylcarbinol
II : flavonol

fig.18 - Spectres de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol et du flavonol correspondant en solution dans du méthanol

3.2.6. APPLICATION DE LA REACTION A LA PREPARATION DE QUELQUES HYDROXY-2 DIBENZOYLCARBINOLS

Les synthèses des produits de départ sont décrites dans la littérature et nous ne citerons à leur propos que les références s'y rapportant ainsi que les points de fusion et les rendements obtenus.

Nous préciserons quelques modifications apportées aux techniques proposées en vue de purifier certaines substances ou d'en améliorer le rendement.

3.2.6.I. Préparation des hydroxy-2 dibenzoylméthanes

A - Préparation des substances de base

a) o-OH acétophénone (§ 3.2.3.2.)

b) dihydroxy-2,4 acétophénone (résacétophénone) (29).

Synthèse réalisée directement par action du chlorure de zinc anhydre fraichement fondu sur l'acide acétique glacial et le résorcinol.

Rendement : 60 %
F : 142-144°C (Litter. 144°C - (29)).

c) Méthoxy-4 hydroxy-2 acétophénone

La résacétophénone (0,I mole) et du sulfate de méthyle (0,I mole) sont mis en présence de 0,12 mole de carbonate de potassium anhydre dans 500 ml d'acétone anhydre et chauffés à reflux pendant 24 heures. La solution acétonique est filtrée. Les traces de matière organique imprégnant le précipité minéral sont dissoutes par de l'acétone. Le solvant est chassé au B-M. Il reste un produit brun-rouge. Par entraînement à la vapeur d'eau, on réalise une excellente purification. Rendement : 65 %, Cristaux blancs, F : 49 - 50°C (Litter. 50°C (2)).

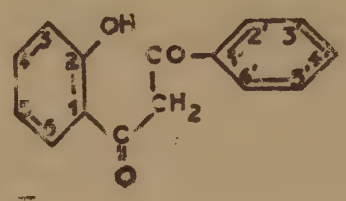
d) Chlorure d'anisoyle

La chloruration est effectuée à l'aide du chlorure de thionyle (0,5 mole) sur l'acide anisique (0,1 mole) à 40°C pendant 4 heures. L'excès de chlorure de thionyle est éliminé par distillation à la pression ordinaire. Le chlorure d'anisoyle est enfin séparé par distillation sous pression réduite. Rendement quantitatif.

$E_{16\ mm}$ ≠ 120-130°C F : 20°C (Litter. 20°C (80)).

B - Synthèse des hydroxy-2 dibenzoylméthanes

La préparation de ces dérivés a été calquée sur celle de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane dont le principe est écrit dans le § (3.2.3.2.).



a) Méthoxy-4' hydroxy-2 dibenzoylméthane

Préparé à partir du chlorure d'anisoyle et de l'o-hydroxy acétophénone

o-anisoyloxyacétophénone Rendement : 80 %
F : 112°C (Litter. 113-114°C (7))

Méthoxy-4' hydroxy-2 dibenzoylméthane : Rendement 65 %
F : 110-112°C (Litter.111°C -(7)).

b) Méthoxy-4 hydroxy-2 dibenzoylméthane

Préparé à partir du chlorure de benzoyle et de la méthoxy-4 hydroxy-2 acétophénone. La méthoxy-4 benzoyloxy-2 acétophénone n'a pu être obtenue à l'état cristallisé

Méthoxy-4 hydroxy-2 dibenzoylméthane, Rendement : 55 %
F : 101-102°C (Litter. 105°C (112))

c) Diméthoxy-4,4' hydroxy-2 dibenzoylméthane

Préparé à partir du chlorure d'anisoyle et de la méthoxy-4 hydroxy-2 acétophénone.

Méthoxy-4 anisoyloxy-2 acétophénone, Rendement : 80 %
F : 84°C (Litter; 84°C (41))

Diméthoxy-4,4' hydroxy-2 dibenzoylméthane, Rendement : 65 %
F : 108-110°C (Litter. 108-110°C (41))

d) Benzoyloxy-4 hydroxy-2 dibenzoylméthane

Préparé à partir du chlorure de benzoyle et de la dihydroxy-2, 4, acétophénone.

Dibenzoyloxy-2,4 acétophénone, Rendement : 77 %
F : 80-81°C (Litter. 80-81°C (6))

Benzoyloxy-4 hydroxy-2 dibenzoylméthane, Rendement : 67 %
F : 165°C (Litter. 167°C (108))

3.2.6.2. Synthèse des hydroxy-2 dibenzoylcarbinols

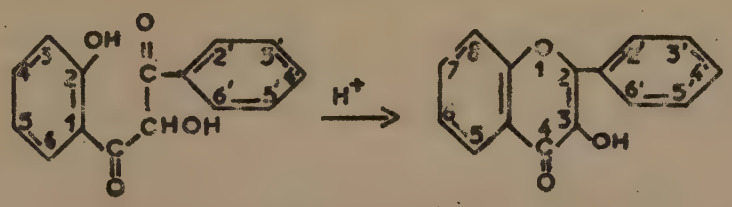
La conduite de l'hydroxylation et les concentrations utilisées sont identiques à celles qui ont été décrites au § (3.2.5.2.) lors de la synthèse de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol : les hydroxy-2 dibenzoylméthanes au contact de l'acide performique, donnent naissance aux hydroxy-2 dibenzoylcarbinols correspondants.

L'instabilité de ces produits rend leur purification difficile par cristallisation, le choix des solvants étant limité à la fois par leur température d'ébullition et la stabilité de ces molécules en leur sein. Ainsi devront être proscrits tous les solvants polaires.

Obtenus sous forme huileuse, ils sont difficiles à recristalliser et il faut attendre 24 à 48 heures la formation des cristaux dans les solvants préconisés, les rendements étant alors souvent faibles.

Enfin, la dessication des produits recristallisés ne peut se faire à chaud car ils se transforment alors en flavonols correspondants. On ne pourra donc réaliser cette dessication que sous vide à la température ordinaire en présence d'anhydride phosphorique.

Les propriétés de ces molécules sont les mêmes que celles qui ont été décrites à propos de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol(§3.2.5.2.).



Méthoxy-4' hydroxy-2 dibenzoylcarbinol.

Après extraction par l'éther, résidu huileux au sein duquel apparaissent des cristaux blancs.

Rendement brut : 55 %

Après recristallisation dans le mélange éther de pétrole (E 38-60°C) - chloroforme (95 : 5) ou dans la ligroïne (E 60-90°C) rendement de 35 %. Cristaux blanc. jaunâtre, F : 154°C

Spectre UV * : λ max 2550 Å, log ε 4,35

Analyse : $C_{16}H_{14}O_5$ Calc. % : C, 67 ,12 H , 4,93

$C_{16}H_{14}O_5,H_2O$ Calc. % : C, 63 ,15 H , 5,30
tr : C, 64 ,5I H , 5,3I

Après traitement par l'acide sulfurique, formation du méthoxy-4' flavonol

F : 222°C, (Litter. 225°C (37)).

Spectre UV : λ max 3100 et 3600 Å, log ε 3,98 et 4,21

Diméthoxy-4, 4', hydroxy-2 dibenzoylcarbinol

A l'état brut, corps huileux brun-jaune où apparaissent des cristaux jaunes. Rendement, 50 %.

Il ne faut pas utiliser la ligroïne (E 60-90°C) pour recristalliser cette substance car la température ainsi atteinte est suffisante pour la transformer en flavonol.

Après recristallisation dans le solvant éther de pétrole (E 38-60°C) chloroforme (95 : 5) le rendement n'est que de 40 %.

Cristaux jaunes clairs, F : 103-104°C.

Spectre UV : λ max 2600 Å, log ε 4,35

Analyse : $C_{17}H_{16}O_6$, Calc % : C 64,55 H, 5,10
tr : C, 64,38 H, 5,26

Après traitement par l'acide sulfurique, formation du diméthoxy 7,4'

flavonol , F : 193°C (Litter. : 196°C (56)).

Spectre UV : λ max 2600, 3225 et 3650 Å, log ε 4,22, 4,18 et 4,30

Méthoxy-4 hydroxy-2 dibenzoylcarbinol

Résidu huileux brun que nous n'avons pas pu recristalliser.

Rendement brut : 40 %.

Il apparaît au sein de la masse huileuse quelques cristaux.

Spectre UV : λ max : 2730 et 3050 Å, log ε 4,16 et 3,84.

Formation du dérivé dibenzoylé :

F : 156°C

Analyse : $C_{30}H_{22}O_7$ Calc % : C, 72,86 H, 4,48
Tr : C, 73,07 H, 4,37

* Tous les spectres ont été déterminés sur ces substances en solution dans le méthanol (0,00002 M).

Ce dibenzoylcarbinol, traité par l'acide sulfurique concentré, donne naissance au méthoxy-7 flavonol,

F : 179°C, (Litter. : 180°C (64)).

Spectre UV : λ max 2550, 3250 Å, log ε 4,14 et 4,16

Benzoyloxy-4 hydroxy-2 dibenzoylcarbinol

Résidu huileux vert clair, au sein duquel apparaissent des cristaux blancs.

Rendement brut : 45 % .

La recristallisation, effectuée dans la ligroïne (E 60-90°C) est longue et le rendement est faible : 20 %.

Cristaux blancs, F : 103°C.

Spectre UV : λ max 2300 et 3100 Å, log ε 4,55 et 3,84.

Analyse : $C_{22}H_{16}O_6$, Calc % : C, 70,21 H, 4,29

$C_{22}H_{16}O_6$, H_2O Calc. % : C, 67,00 H 4,60

Tr : C, 68,06 H 4,12

Cette analyse semble correspondre à une forme partiellement déshydatée de la molécule. Après contact prolongé avec l'acide sulfurique concentré, il y a débenzoylation et il se forme l'hydroxy-7 flavonol :

F : 255°C, (Litter. 257°C (64)).

Spectre UV : λ max 2550 et 3450 Å, log ε 4,06 et 4,18.

3.3. DISCUSSION

L'étude du comportement des flavones soumises à l'action du radical libre hydroxyle obtenu par activation de l'oxygène moléculaire sous l'influence de l'ion ferreux chélaté en présence d'acide ascorbique, montre que l'hydroxylation porte en premier lieu sur le noyau phényle latéral de ces substrats. Cependant, lorsque les conditions expérimentales d'une telle réaction sont modifiées, il se forme de l'hydroxy-3 flavone (flavonol). Après avoir précisé les conditions permettant cette dernière réaction, nous en examinerons les mécanismes éventuels.

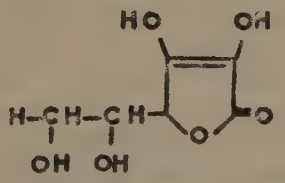
3.3.I. FORMATION DU FLAVONOL AU COURS DE PROCESSUS RADICALIQUES HYDROXYLANT

3.3.I.I. Par voie chimique

Cette hydroxylation est favorisée par une augmentation des concentrations du réactif hydroxylant mais la température et la présence d'acide ascorbique sont les deux facteurs essentiels qui conditionnent cette synthèse.

Il semble exister un seuil de température - 65°C - à partir duquel le flavonol se forme en quantité relativement importante. Ainsi se trouverait expliquée l'absence de cette substance parmi les flavones hydroxylées obtenues à l'aide du réactif d'Udenfriend utilisé à 37°C.

La présence d'acide ascorbique dans le réactif est indispensable à la formation du flavonol. On ne peut donc attribuer à cet ène-diol



un simple rôle de co-réducteur. Le flavonol n'est en effet pas obtenu par hydroxylation de la flavone à l'aide du réactif de Fenton (peroxyde d'hydrogène et chélate ferreux) à 75°C.

3.3.I.2. Par voie radiochimique

Quand une radiation ionisante est absorbée par de l'eau, il se crée des photoélectrons et des électrons Compton. Ces électrons arrachent aux molécules

des électrons secondaires de plus faible énergie. Ceux-ci ont un parcours relativement plus faible et produisent par leur passage à proximité immédiate des molécules d'eau des ions positifs H_2O^+ et des électrons de faible énergie cinétique, le plus souvent incapables d'ioniser une nouvelle molécule.

Les particules incidentes primaires perdent également leur énergie en créant dans un champ beaucoup plus large autour de la trajectoire des phénomènes d'excitation des molécules d'eau.

A partir des ions et molécules excitées, se forment par neutralisation des radicaux libres promoteurs de la plupart des effets observés sur les solutés, effets dits "indirects" ayant lieu par l'intermédiaire du solvant (68).

Le mécanisme exact du passage de la molécule excitée H_2O^* , de l'ion H_2O^+ et de l'électron e^- à ces radicaux n'est pas encore éclairci.

WEISS, le premier en 1944, a montré la formation de tels radicaux selon le schéma (117) :

$$H_2O^+ \longrightarrow H^+ + HO.$$

$$H_2O + e^- \longrightarrow OH^- + H.$$

De façon plus générale, on peut écrire (68) :

$$\left.\begin{array}{l} H_2O \rightsquigarrow H_2O^+ + e^- \\ H_2O \rightsquigarrow H_2O \end{array}\right\} \longrightarrow G_1(H_2) + G_2(HO) + \Sigma_i \; G\,x_i\,(x_i)$$

où $G = \dfrac{\text{nombre de molécules ou d'équivalents}}{\text{100eV d'énergie absorbée}}$

et x_i représente un certain nombre de produits encore mal caractérisés.

Ainsi, la formation de radicaux libres hydroxylés et d'atomes d'hydrogène dans l'eau irradiée permet de comparer les résultats de ces irradiations à ceux obtenus au cours de réactions pour lesquelles la production de radicaux libres est bien établie. Dans un certain nombre de cas, il a déjà été montré qu'il existe une similitude frappante entre l'action des radicaux libres hydroxyles et celles des radiations ionisantes (1 - 32 - 105). Nous avons trouvé de même que la flavone, en solution aqueuse tamponnée et en équilibre avec l'air, soumise à un bombardement de rayons γ émis par du ^{60}Co, est hydroxylée préférentiellement sur le noyau phényle latéral. Ces résultats sont identiques à ceux que nous avons déjà décrits au tableau I. Il ne se forme pas de flavonol et cette synthèse ne peut donc être attribuée au seul radical libre hydroxyle.

Les conditions expérimentales (augmentation de température, présence d'acide ascorbique) présentes au cours de l'hydroxylation par voie chimique, semblent introduire un nouveau processus.

3.3.2. FORMATION DU FLAVONOL APRES INHIBITION DU PROCESSUS RADICALIQUE HYDROXYLANT

La suppression de l'ion ferreux dont l'oxydation induit la genèse du radical libre hydroxyle dans le réactif d'Udenfriend et l'addition d'inhibiteurs de l'oxydation des ions métalliques (86) aurait dû permettre, tout en conservant des concentrations optimales de peroxyde d'hydrogène et d'acide ascorbique, d'inhiber sélectivement le processus radicalique.

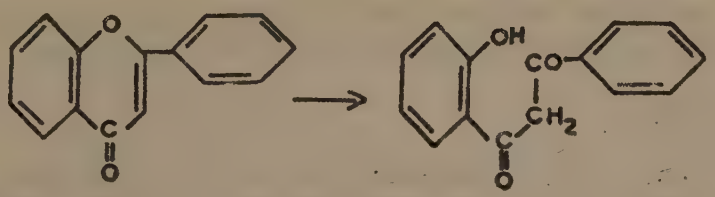
Bien que cette inhibition ne soit pas parfaite, on note une augmentation de la proportion de flavonol obtenue.

D'après KOLTHOFF et MEDALIA (63), la présence d'un solvant organique inhibe les processus d'hydroxylation radicalique. Ce phénomène peut être rattaché à une attaque préférentielle du solvant en excès par le radical libre hydroxyle.

Le diméthylformamide (DMF) a été choisi en raison de ses propriétés solvantes, sa miscibilité avec de l'eau, sa non volatilité et sa stabilité à des températures relativement élevées.

L'addition d'un tel solvant dans le milieu réactionnel inhibe totalement le processus radicalique puisqu'aucune des flavones hydroxylées, décrites dans le tableau I, n'est retrouvée.

En revanche, il se forme à la fois du flavonol et de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane. L'augmentation de la température et de la concentration en peroxyde l'hydrogène à pH 7,5, la présence d'un solvant organique de constante diélectrique élevée sont des conditions suffisantes pour provoquer l'hydrolyse de la flavone en cette β dicétone classiquement obtenue par traitement alcalin.



L'hydroxy-2 dibenzoylméthane, traité dans les mêmes conditions que la flavone par le peroxyde d'hydrogène et l'acide ascorbique dans le DMF, donne naissance à des quantités relativement importantes de flavonol, ce qui tendrait à prouver que celui-ci ne se forme pas directement à partir de la flavone, mais d'un composé intermédiaire dont les propriétés chimiques sont sensiblement différentes.

3.3.3. FORMATION DU FLAVONOL A PARTIR DE L'HYDROXY-2 DIBENZOYLMETHANE PAR ACTION DU REACTIF ACIDE ASCORBIQUE-PEROXYDE D'HYDROGENE

En solutinn dans le DMF, ce substrat est transformé en flavonol sous l'influence de l'acide ascorbique et du peroxyde d'hydrogène.

Cette réaction s'effectue à un pH optimal de 4 et pourrait ainsi être de nature électrophile. Le rendement augmente avec la température jusqu'à 80°C. Une activation thermique du substrat ou du réactif semble devoir être admise, activation que nous avions attribuée à l'acide ascorbique (§ 2.3.3.). Cet ène-diol se montre indispensable à la réaction qui peut être effectuée même en l'absence de peroxyde d'hydrogène.

A un pH inférieur à 7,6, il est admis que l'acide ascorbique ne peut activer de l'oxygène moléculaire en l'absence de catalyseurs métalliques (12 - 58 - 94). Leur intervention au cours de ce processus hydroxylant a pu être démontrée : l'addition d'EDTA dans le milieu réactionnel inhibe la synthèse du flavonol. La chélation de certains ions par l'EDTA peut, en effet, soit activer leur oxydation - Fe^{2+} - soit l'inhiber - Cu^{+} - (86). L'ion métallique ainsi mis en cause pouvait être le cuivre. Mais ce dernier, en excès dans le milieu réactionnel, inhibe aussi la réaction.

L'explication d'une telle contradiction doit être recherchée dans le mécanisme même de la catalyse. Selon DUFRAISSE (36),

"un catalyseur peut inverser son action quand on l'oppose à divers corps, mais il peut aussi bien agir dans les deux sens sur l'oxydation d'un même corps suivant les conditions expérimentales.... un composé fonctionne dans le sens "anti" pour une concentration, et dans le sens "pro" pour une autre".

Au cours de l'oxydation catalytiquement induite de l'acide ascorbique (H_2A), le peroxyde d'hydrogène peut se former suivant deux mécanismes :

- Autoxydation de l'ion Cu^{+}

Selon BARRON et coll (12) l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions Cu^{2+} se réaliserait par transfert de deux électrons, suivi d'une autoxydation du Cu^{+} par l'oxygène moléculaire et apparition de peroxyde d'hydrogène :

$$H_2A + 2\,Cu^{2+} \longrightarrow A + 2\,Cu^{+} + 2\,H^{+} \qquad (1)$$

$$2\,Cu^{+} + 2\,H^{+} + O_2 \longrightarrow 2\,Cu^{2+} + H_2O_2 \qquad (2)$$

- Autoxydation par un intermédiaire radicalique

Pour WEISSBERGER et coll(118) l'ion Cu^{2+} pourrait être chélaté par l'ion monovalent ascorbate. Après transfert électronique au métal, le chélate cuivreux peu stable se dissocierait créant une étape radicalique transitoire, formation du radical ascorbique (HA.) ou acide monodéhydroascorbique (14 - 34 - 47). Ce radical, par autoxydation avec l'oxygène moléculaire, peut se transformer en acide déhydroascorbique (A) et former le radical perhydroxyle (HO_2.) qui réagissant avec l'ion

Cu^{+} donne du peroxyde d'hydrogène. D'une façon plus générale, on peut écrire :

$$HA^{-}H^{+} + Me^{n+I} \longrightarrow Me^{n} + H^{+} + HA. \quad (3)$$

$$HA. + O_2 \longrightarrow A + HO_2. \quad (4)$$

$$HO_2^{-}. + Me^{n} \longrightarrow HO_2^{-} + Me^{n+I} \quad (5)$$

$$HO_2 + H^{+} \longrightarrow H_2O_2 \quad (6)$$

La formation de peroxyde d'hydrogène au cours de ces réactions explique l'hydroxylation réalisée en présence d'oxygène moléculaire.

Il a été observé une synergie entre cet acide et le peroxyde d'hydrogène se traduisant par un rendement maximal pour un rapport $(H_2A)/(H_2O_2)$ égal à 2.

La présence de l'eau est indispensable à la réaction qui ne s'effectue, dans le DMF pur, qu'avec un rendement très faible.

En dernier lieu, il faut remarquer que, même dans les meilleures conditions, il reste toujours une certaine quantité de substrat non attaquée, la réaction n'est pas complète.

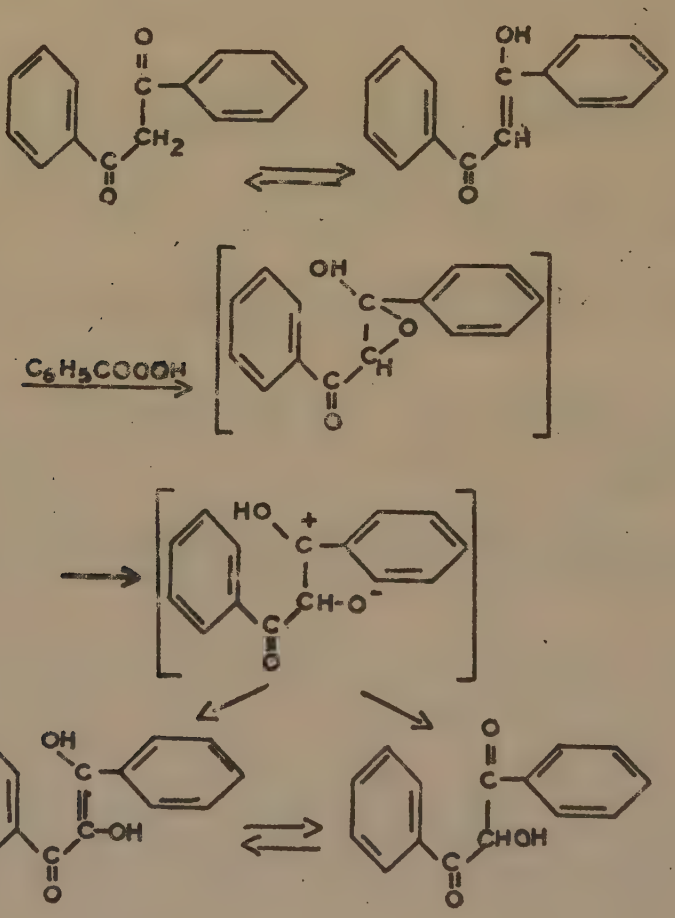
Un réactif hydroxylant ionique - peroxyde d'hydrogène, acide ascorbique, catalyseur métallique, eau - n'a pas encore été décrit, du moins à notre connaissance dans la littérature.

Afin de prouver, par analogie, la nature électrophile de cette réaction, nous avons étudié l'action d'un réactif électrophile classique, peracide, sur l'hydroxy-2 dibenzoylméthane.

3.3.4. COMPORTEMENT DE L'HYDROXY-2 DIBENZOYLMETHANE TRAITE PAR UN PERACIDE

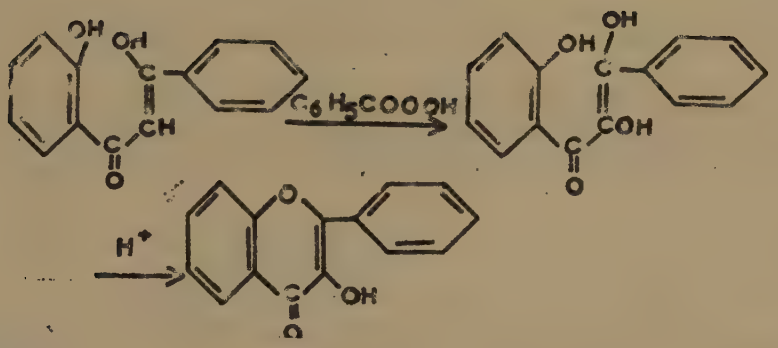
KARRER et coll (60 - 62 - 61) étudiant le devenir du dibenzoylméthane traité par l'acide perbenzoïque dans le chloroforme à froid, avait réussi à isoler non pas l'époxyde, mais le dibenzoylcarbinol avec un rendement intéressant.

Il admet le mécanisme suivant :



WHEELER (119) suivant le processus expérimental décrit par KARRER, avait obtenu à partir des hydroxy-2 dibenzoylméthanes, non pas les hydroxy-2 dibenzoylcarbinols, mais les flavonols correspondants.

Le mode opératoire utilisé lors de cette réaction semble être la cause d'un tel phénomène. L'hydroxylation a été effectuée à l'aide de l'acide perbenzoïque dans du chloroforme qui est évaporé sous vide à la fin de la réaction. L'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol formé doit se transformer en flavonol au contact du peracide pur.



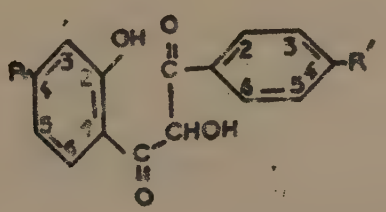
Nous avons mis au point une technique permettant l'isolement des hydroxy-2 dibenzoylcarbinols formés à partir des mêmes substrats que ceux étudiés par WHEELER ce qui complète son travail.

L'addition de peroxyde d'hydrogène dans une solution acétique d'hydroxy-2 dibenzoylméthane donne naissance extemporanément à de l'acide peracétique. Mais une telle réaction ne s'effectue avec un bon rendement qu'en présence d'un catalyseur, l'acide sulfurique. Dans de telles conditions, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane se transforme en flavone.

Par contre, en présence d'acide formique et de peroxyde d'hydrogène, il se forme au sein de cette solution acétique, de l'acide performique plus réactif, la présence d'un catalyseur se révélant alors inutile.

Les produits formés sont extraits du milieu réactionnel par un solvant organique.

Nous avons ainsi préparé quelques hydroxy-2 dibenzoylcarbinols, non encore décrits dans la littérature.



$R = R' = H$

$R = H$; $R' = OCH_3$

$R = OCH_3$; $R' = H$

$R = OCH_3$; $R' = OCH_3$

$R = OCOC_6H_5$; $R' = H$

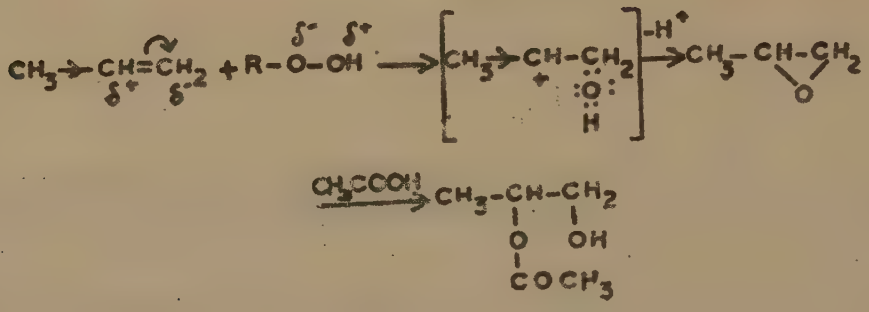
3.3.4.I. Mécanisme de la réaction

L'obtention de glycols à partir d'oléfines traitées par un peracide (95) est un procédé de synthèse classiquement utilisé en chimie organique (50).

Si la réalisation pratique et la stéréochimie de cette hydroxylation sont bien

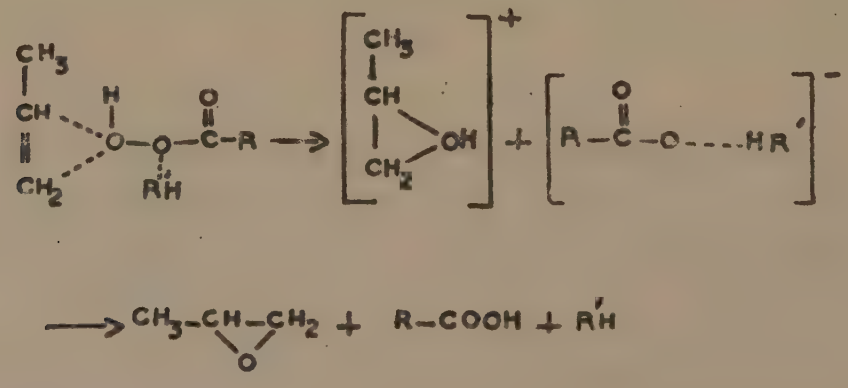
connues, son mécanisme exact ne l'est encore qu'assez peu.

Selon SWERN (107), l'hydroxylation par les peracides pourrait être caractérisée par la formation dans le milieu réactionnel d'ions HO^+, de charge électropositive, se fixant sur les positions électronégatives des oléfines.



La chaine époxy ainsi formée, peut s'ouvrir sous l'influence d'un acide, ouverture caractérisée par une inversion de Walden, donnant naissance au dérivé monoacyclé du glycol.

En fait, la stéréospécificité de cette réaction ferait admettre, toujours selon cet auteur, la formation d'un ion carbonium libre intermédiaire. Entre l'acide (R'H)présent dans le milieu réactionnel, le peracide et l'oléfine, les réactions suivantes pourraient être envisagées :



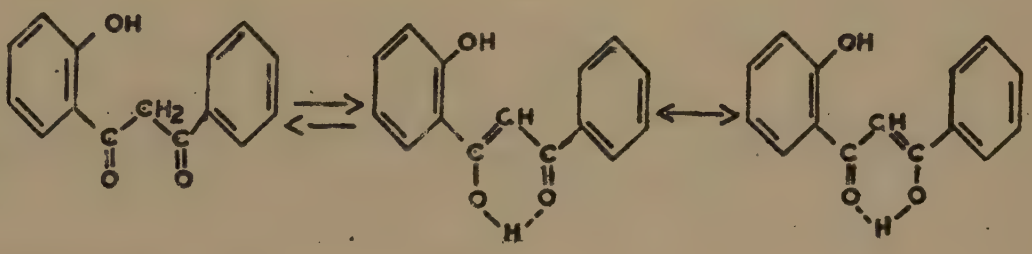
Cette réaction s'effectue avec plus ou moins de facilité suivant la nature des substituants de l'oléfine. Ainsi la substitution de ces molécules par des groupements susceptibles d'accepter un doublet électronique, tel l'oxygène des groupements carbonyles abaisse très fortement le rendement de la réaction. Il est difficile d'oxyder suivant ce processus les cétones ou les acides α,β insaturés.

Nous avons vérifié que la flavone, cétone α-β insaturée, n'est transformée en

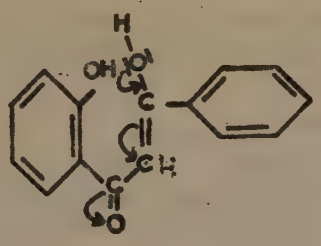
flavonol sous l'influence de l'acide peracétique qu'avec un rendement très faible (1,5 %).

BOESEKEN et JACOBS (17) ont montré, par contre, que cette réaction pouvait être effectuée sur les cétones énolisables, réaction malaisée exigeant un excès de peracide.

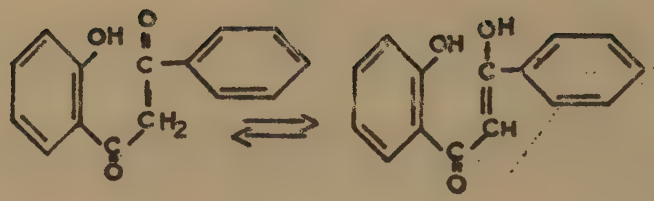
Or l'hydroxy-2 dibenzoylméthane existe sous une forme énolique stable (81) due à la résonance d'un carbonyle avec la double liaison conjuguée provenant de l'énolisation du second carbonyle. Cette stabilisation est encore accentuée par la chélation due à l'hydrogène énolique et par la présence des deux noyaux aromatiques.

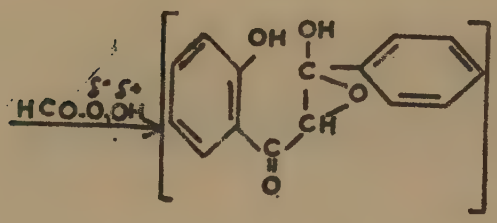


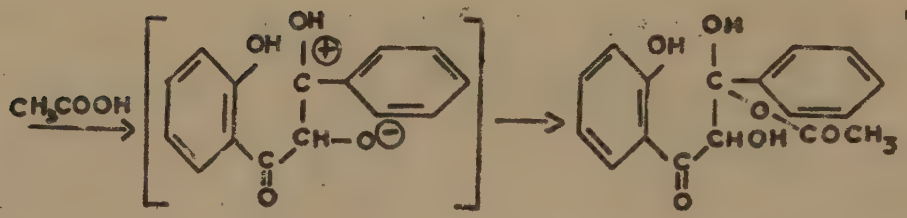
L'atome d'oxygène du groupement énolique, susceptible de céder un doublet électronique, augmente la densité électronique du carbone central, orientant les attaques électrophiles en cette position.



Sur cette molécule, apte à subir une attaque électrophile, nous aurions dû obtenir par action de l'acide performique dans l'acide acétique, suivant le schéma de KARRER, de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol acétylé.



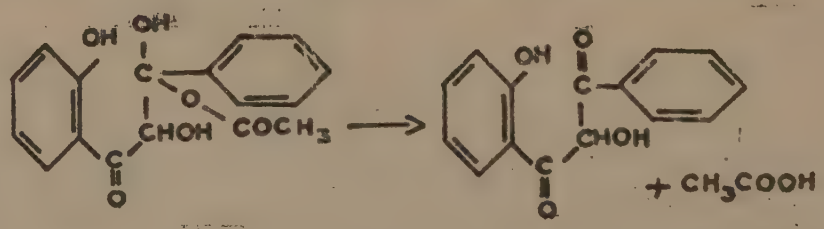




Il n'en est rien et l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol a été obtenu sous une forme non acétylée.

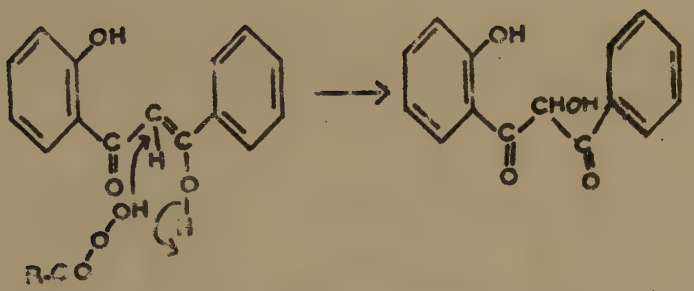
Deux hypothèses peuvent être émises :

- l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol acétylé, trop instable, se désacétyle spontanément dans le milieu réactionnel ou au cours de son extraction.



- la β dicétone sous sa forme énolique, subit l'attaque directe du peracide. Un tel mécanisme a été suggéré par HOUSE et GANNON (55).

Ainsi sur l'hydroxy-2 dibenzoylméthane,



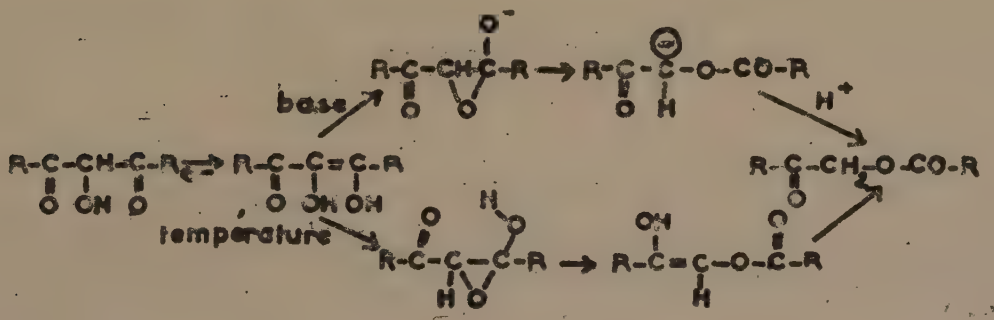
S'il semble selon SWERN, qu'il faille admettre au cours de cette réaction, l'intervention d'ions HO^+, nous ne pouvons en fonction des résultats obtenus, affirmer que l'attaque ait lieu directement plutôt que par l'intermédiaire d'un époxyde.

3.3.4.2. Propriétés des hydroxy-2 dibenzoylcarbinols

Les dibenzoylcarbinols sont très instables.

BLATT et HAWINKS (16), KARRER (60), ont montré que, sous l'influence soit d'agents alcalins, soit d'une élévation de température, la première étape des transformations subies par ces molécules se caractérisait par la formation d'isomères : benzoates de benzoylcarbinols.

D'après HOUSE et GANNON (55).



Lorsque le dibenzoylcarbinol est traité par une solution d'hydroxyde de sodium N à l'ébullition, la dégradation est immédiate :

$$(C_6H_5 - CO - CHOH - CO - (C_6H_5 \xrightarrow[H_2O]{NaOH} (C_6H_5\,COO\,Na + (C_6H_5\,CO\,CH_2OH$$

L'influence des agents alcalins dans ces conditions est la même sur l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol et nous avons toujours pu caractériser l'acide salicylique formé.

Le chauffage de l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol ne nous a pas permis d'isoler le benzoate de l'hydroxy-2 benzoylcarbinol qui aurait dû se former. L'isomérisation doit être précédée d'une déshydratation de la molécule qui conduit au flavonol.

Cet ester n'a pu être isolé non plus à l'état pur lorsque l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol est traité par une solution saturée de carbonate acide de sodium à froid : il se forme toujours en même temps du flavonol et de l'acide salicylique.

Tous les hydroxy-2 dibenzoylcarbinols que nous avons préparés présentent ces propriétés.

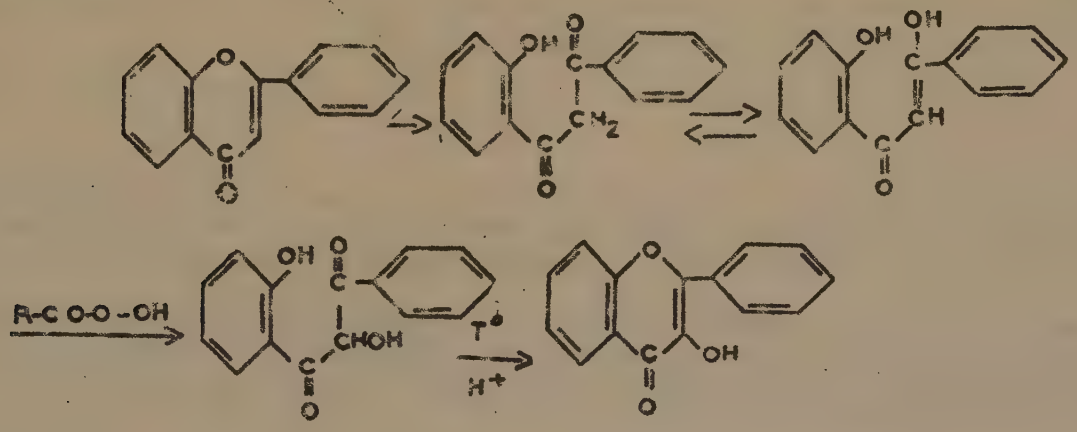
3.3.5. INTERPRETATION GENERALE DES RESULTATS

Le comportement des flavones attaquées par le radical libre hydroxyle est toujours identique quelque soit son mode de formation, chimique (réactifs d'UDENFRIEND ou de FENTON amélioré) ou radiochimique.

Il se forme toujours en premier lieu des flavones hydroxylées sur le noyau phényle latéral en 4' puis 3'.

Cependant en ce qui concerne le réactif d'UDENFRIEND l'augmentation et de la concentration du réactif hydroxylant et de la température, sont des conditions suffisantes pour provoquer l'hydrolyse de la flavone en une β dicétone, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane. Cette structure rend la molécule apte à subir une attaque de type électrophile.

Traité par un peracide, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane se transforme en hydroxy-2 dibenzoylcarbinol instable, qui peut lui-même se recycliser en flavonol sous l'influence soit d'une élévation de température, soit d'un acide minéral fort.



Cette même réaction peut être réalisée à l'aide de certains constituants du réactif hydroxylant d'Udenfriend, acide ascorbique, peroxyde d'hydrogène formé extemporanément dans le milieu réactionnel, catalyseur métallique. Cependant, l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol intermédiaire n'a pu dans ce cas être caractérisé.

En effet, la réaction effectuée à l'aide de ce dernier réactif hydroxylant n'est pas complète. Il reste, en présence des produits formés, de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane, substrat de départ. La séparation de ces dérivés ne peut être réalisée qu'après un traitement préalable par l'acide sulfurique, au cours duquel l'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol éventuellement formé se recyclise en flavonol.

On peut émettre néanmoins par analogie, l'hypothèse qu'il existe un réactif ionique électrophile composé d'acide ascorbique, de peroxyde d'hydrogène et d'un catalyseur métallique.

L'hydroxylation effectuée à l'aide de ce réactif peut inclure au cours du processus réactionnel, l'intervention d'ions HO^+, formés dans le milieu réactionnel soit directement soit par l'intermédiaire d'un acide perascorbique.

Formation d'un acide perascorbique.

La synergie indiscutable, constatée entre l'acide ascorbique et le peroxyde d'hydrogène et se manifestant à des températures relativement élevées, pourrait faire émettre l'hypothèse selon laquelle il se formerait transitoirement un acide perascorbique.

Dans ce cas l'attaque électrophile de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane pourrait avoir lieu suivant les mécanismes envisagées au § précédent.

Mais dans un tel contexte, il est difficile d'expliquer la nécessité d'un catalyseur métallique.

Attaque directe par un ion HO^+

L'existence de l'ion HO^+ a été invoquée par plusieurs auteurs (32 - 100) pour justifier l'hydroxylation de certains composés par action du peroxyde d'hydrogène en milieu acide, Ils admettent la réaction suivante :

$$H^+ + HOOH \longrightarrow (H_3O_2)^+ \longrightarrow H_2O + HO^+$$

L'ensemble des faits expérimentaux que nous avons décrits, la nature des éléments du réactif hydroxylant (catalyseur métallique, eau, acide ascorbique peroxyde d'hydrogène) utilisé, nous ont fait émettre l'hypothèse suivante.

Les ions HO^+ pourraient être formés par transfert de deux électrons de l'acide ascorbique (H_2A) au radical perhydroxyle $HO_2.$, obtenu soit à partir de l'acide monodéhydroascorbique et de l'oxygène moléculaire (§ 3.3.3. réaction 4) soit à partir du peroxyde d'hydrogène (51).

$$HO_2^-H^+ + Me^{n+I} \longrightarrow HO_2. + H^+ + Me^n \qquad (5)$$

$$HO_2. + H_2A \longrightarrow A + (H_3O_2)^+ \longrightarrow H_2O + HO^+ \qquad (6)$$

Selon un autre mécanisme, l'acide monodéhydroascorbique (HA.), formé au cours de la réaction 3 (§ 3.3.3.), donnerait naissance, au contact du peroxyde d'hydrogène par transfert d'un seul électron, à de l'acide déhydroascorbique (A) et à des ions HO^+

$$HA. + H_2O_2 \longrightarrow A + (H_3O_2)^+ \quad H_2O + HO^+ \qquad (7)$$

Quoique l'existence des ions HO^+ en solution aqueuse ait été mise en doute (28), cette hypothèse n'en reste pas moins un instrument de travail qui nous permet

d'expliquer le type électrophile d'une réaction intervenant au cours de processus radicaliques.

Les propriétés hydroxylantes du réactif d'UDENFRIEND ont été rapportées par l'auteur lui-même (21) à un processus électrophile. Un tel mécanisme a été refuté par de nombreux auteurs, (1 - 20 - 75) qui n'envisagent qu'un processus radicalique. L'ensemble de nos résultats permet de concilier les deux théories en présence : l'intervention de l'un des deux mécanismes, radicalique ou ionique nous paraît dépendre en fait, et du substrat et des conditions expérimentales.

Une telle dualité explique les résultats qu'avaient déjà notés REVOL, NOFRE et CIER (99), au cours de l'étude de l'hydroxylation des stéroïdes.

C O N C L U S I O N S

Nous avons étudié l'hydroxylation de substrats flavoniques traités par des réactifs à processus radicalique, réactif d'UDENFRIEND (ion ferreux chélaté, oxygène moléculaire et acide ascorbique) ou réactif de Fenton exalté par chélation de l'ion ferreux à l'EDTA.

Le comportement des flavones s'est révélé identique à 37°C sous l'influence de ces deux réactifs. L'hydroxylation ainsi réalisée, de type radicalique, se porte préférentiellement sur le noyau phényle latéral de ces molécules et la formation des hydroxy-4' puis 3' flavones est prépondérante. Il ne se forme pas dans ces conditions d'hydroxy-3 flavone (flavonol).

L'augmentation, et de la concentration du réactif utilisé, et de la température, est une condition suffisante pour provoquer une hydrolyse de la flavone qui se transforme en une β dicétone, l'hydroxy-2 dibenzoylméthane.

Ce composé, sous l'influence de l'acide ascorbique présent dans le réactif d'UDENFRIEND, donne naissance à du flavonol selon un processus ionique électrophile.

L'hydroxy-2 dibenzoylcarbinol qui serait formé au cours d'un tel processus a pu être isolé lors de l'attaque de l'hydroxy-2 dibenzoylméthane par un peracide. Nous avons préparé ainsi quelques hydroxy-2 dibenzoylcarbinols non encore décrits dans la littérature.

Procédant par analogie, nous avons émis certaines hypothèses sur le mécanisme d'action d'un réactif hydroxylant électrophile, composé d'acide ascorbique de peroxyde d'hydrogène et de traces d'un catalyseur métallique.

A la lumière de ces résultats, on peut admettre que le rôle de l'acide ascorbique dans le réactif d'UDENFRIEND est double :

- co-réducteur, il réduit l'ion ferrique formé en ion ferreux dont l'oxydation induit la génèse du radical libre hydroxyle.

- il donne naissance à un mécanisme ionique électrophile.

Cette étude ne nous paraît pas dénuée d'intérêt à trois points de vue :

I - Théorique : elle montre la coexistence possible dans le même réactif hydroxylant de deux mécanismes, l'un ionique, l'autre radicalique.

L'interprétation des résultats obtenus à l'aide du réactif d'UDENFRIEND doit donc toujours être nuancée. Ce n'est qu'après avoir effectué une étude comparative de l'hydroxylation d'un même substrat à l'aide de divers réactifs hydroxylants radicaliques ou ioniques, qu'on pourra conclure en faveur d'un des mécanismes réactionnels possibles.

2 - Pratique : L'hydroxylation préférentielle obtenue à l'aide du réactif d'UDENFRIEND suivant des conditions de concentrations et de température bien déterminées, devrait permettre l'utilisation d'un tel réactif en vue de la préparation à une très faible échelle, par exemple celle de témoins pour chromatographie, de flavones hydroxylées sur le noyau phényle latéral. L'intérêt de cette méthode réside dans sa mise en oeuvre facile et dans la rapidité de son exécution.

3 - Biogénétique : L'hydroxylation directe du noyau phényle latéral des flavones n'avait jamais encore été réalisée à l'aide d'un système chimique. L'hydroxylation biologique de ce noyau pourrait, ainsi, être attribuée à un processus radicalique.

La formation biologique du flavonol pourrait être plus spécialement rapportée à la présence d'acide ascorbique dans les organiques végétaux. Selon l'équation de BIRCH et DONOVAN, l'obtention du squelette de base flavonique par condensation d'unités acétates avec des dérivés du phénylpropane passerait par l'intermédiaire de composés β dicétoniques. Le flavonol se formerait peut être à ce stade par hydroxylation électrophile sous l'influence de l'acide ascorbique selon l'un des mécanismes que nous avons envisagé.

Bien qu'il existe, d'après MENTZER,

"peu de points communs entre les procédés de synthèse utilisés par les végétaux et ceux qui sont pratiqués au laboratoire par l'organicien" (78),

il est possible que le système d'UDENFRIEND, réactif hydroxylant à processus à la fois radicalique et ionique, représente artificiellement un système, modèle de ceux qui sont mis en oeuvre dans la nature.

Le Président de la Thèse :

Monsieur le Professeur B. DREVON

VU et permis d'imprimer :

LYON, le 6 Octobre 1961

VU, le Doyen :

H. HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

(I) R.M.ACHESON et C.M. HAZELWOOD, Biochim. biophys. Acta, 1960, 42, 49

(2) R.ADAMS, J. am. chem. Soc., 1919, 41, 260

(3) J. ALGAR et J.P. FLYNN, Proc. Roy. Irish Acad., 1934, B42, I

(4) N. ANAND, R.N. IYER, K. VENKATARAMAN, Proc. Indian Acad. Sci., 1949, A29, 203

(5) S. ARONOFF, J. org. Chem.,1940, 5, 561

(6) W. BAKER, J. Chem. Soc., 1933, 1381

(7) W. BAKER et F. GLOCKING, J. Chem. Soc., 1950, 2759

(8) W. BAKER et N.C. BROWN, J. Chem. Soc., 1948, 2303

(9) K.J. BALAKRINA, T.R. SESHADRI et G. VISWANATH, Proc. Indian Acad. Sci., 1949, A30, 120

(10) W.G. BARB, J.H. BAXENDALE, P. GEORGE et K.H. HARGRAVE, Trans. Faraday Soc. 1946, 42, 155

(11) G. BARGELLINI et A. OLIVIERO, Ber., 1942, 75B, 2083

(12) E.G. BARRON, R.H. DE MEIO et F. KLEMPERER, J. biol. Chem., 1936, 112, 625

(13) J. BAXENDALE, Reilly Lectures X, Univ. Notre-Dame Press, Indiana

(14) N. BEZSSONOFF, M. WOLOSZYN et H. LEROUX, Z. Vitaminforsch, 1943, 13, 37

(15) A.J. BIRCH et F.W. DONOVAN, Austral. J. Chem., 1953, 6, 360

(16) A.H. BLATT et W.L. HAWKINS, J. am. chem. Soc., 1936, 58, 81

(17) J. BOESEKEN et J. JACOBS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, 1936, 55, 804

(18) L. BOGORAD, Annu.Rev. Plant Physiol., 1958, 9, 417

(19) M.M. BOKADIA, B.R. BROWN et W. CUMMINS, J. Chem. Soc., 1960, 3308

(20) R. BRESLOW et L.N. LUKENS, J. biol. Chem., 1960, 295, 292

(21) B.B. BRODIE, J. AXELROD, P.A. SHORE et S. UDENFRIEND, J. biol. Chem., 1954, 208, 741

(22) G.W.K. CAVILL, F.M. DEAN, A. Mc GOOKIN, B.M. MARSHALL et A. ROBERTSON, J. chem. Soc., 1954, 4573

(23) A. CIER et C. NOFRE, Bull. Soc. Chim., 1959, 1523

(24) A. CIER, C. NOFRE et A. REVOL, C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 542

(25) F.C. CHEN et C.H. LIN, J. Formosan Sci., 1952, 6, 81

(26) P. COMTE, A.VILLE, G. ZWINGELSTEIN, J. FABRE-BONVIN et C. MENTZER, Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 1117

(27) P. COMTE, A. VILLE, G. ZWINGELSTEIN, J. FABRE-BONVIN et C. MENTZER, Bull. Soc. Chim. biol., 1960, 42, 1979

(28) C.A. COULSON, J. Chem. Soc., 1956, 778

(29) S.R. COOPER, Organic Syntheses, 21, 103

(30) B. CUMMINS, D.M.X. DONNELLY, E.M. PHILBIN, J. SWIRSKI et T.S. WHEELER, Chem. and Ind., 1960, 348

(31) C.E. DANIELSON, Ark. Kemi, 1953, 5, 173

(32) D.H. DERBYSHIRE et W.A. WATERS, Nature, 1950, 165, 401

(33) O. DIMROTH et R. SCHWEIZER, Ber, 1923, 56, 1375

(34) P. DOUZOU, Thèse Doctorat ès Sciences, Lyon, 1959

(35) A.M. DOWNES, Austral. J. Chem. 1958, 11, 154

(36) C. DUFRAISSE, Traité Chimie Organique Grignard, t.2, 1147

(37) A. EDELSTEIN et St V. KOSTANECKI, Ber 1905, 38, 1507

(38) K. ELBS, Z. Prakt. Chem., 1893, 48, 179

(39) M.G. EVANS, P. GEORGE et N. URI, Trans. Faraday Soc., 1949, 45, 230

(40) H.J.H. FENTON, J. Chem. Soc., 1894, 65, 899

(41) D.M. FITZGERALD, J.F. O'SULLIVAN, E.M. PHILBIN et T.S. WHEELER, J. Chem. Soc., 1955, 860

(42) W.E. FITZMAURICE, W.I. O'SULLIVAN, E.M. PHILBIN, T.S. WHEELER et T.A. GEISSMAN, Chem. and Ind., 1955, 652

(43) T.A. GEISSMAN, Modern Methods of plant analysis, Vol III, Springer Verlag, Berlin, 1950, 450

(44) T.A. GEISSMAN et D.K. FUKUSHIMA, J. amer. Chem. Soc., 1948, 70, 1686

(45) T.A. GEISSMAN, J.W. MASON et J.R. ROWE, Chem. and Ind., 1959, 1577

(46) T.A. GEISSMAN et J. SWAIN, Chem. and Ind., 1957, 984

(47) E. GERO et P. LE GALLIC, Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 548

(48) H. GRISEBACH, Naturforschung, 1957, 12b, 227
1959, 14b, 802

(49) S. GROSSMANN et St V. KOSTANECKI, Ber. 1900, 33, 2516

(50) F.D. GUNSTONE, Adv. Org. Chem., 1960, I, 103

(51) F. HABER et J. WEISS, Proc. Roy. Soc., 1934, 147A, 332

(52) L. HAGDAHL et C.E. DANIELSON, Nature, 1954, 174, 1062

(53) J. B. HARBORNE, Chem. and Ind., 1954, 1142

(54) J. B. HARBORNE, J. Chromatog., 1959, 2, 581

(55) H.O. HOUSE et W.F. GANNON, J. org. Chem., 1958, 23, 879

(56) K. JUPPEN et St. V. KOSTANECKI, Ber., 1904, 37, 4161

(57) L. JURD, Arch. Biochem. Biophys., 1956, 63, 378

(58) A.E. KELLIE et J.S. ZILVA, Biochem. J., 1935, 29, 1029

(59) D. KERTESZ et O. AZZOPARDI, Bull. Soc. Chim. biol., 1960, 42, 945

(60) P. KARRER, J. KEBRLE et R.M. THAKKAR, Helv. chim. Acta, 1950, 33, 1711

(61) P. KARRER, J. KEBRLE et V. ALBERS-SCHONBERG, Helv. chim. Acta, 1951, 34, 1014

(62) P. KARRER, V. ALBERS-SCHONBERG et J. KEBRLE, Helv. chim. Acta, 1952, 35, 1498

(63) I.M. KOLTHOFF et A.I. MEDALIA, J. amer. chem. Soc., 1949, 71, 3777, 3784, 3789

(64) St. V. KOSTANECKI et M.L. STOPPANI, Ber., 1904, 37, 1180

(65) St. V. KOSTANECKI et J. TAMBOR, Ber., 1901, 34, 1690

(66) P. LEBRETON, Thèse Ing. Doct., Fac. Lyon, 1960

(67) M. LEDERER, Nature, 1950, 165, 529

(68) M. LEFORT, Actions chimiques et Biologiques des radiations, lère série, Masson, Paris, 1955

(69) G.N. LEWIS et M. CALVIN, Chem. Revs., 1939, 25, 273

(70) G. LINDSTEDT et A. MISIORNY, Acta chem. scand., 1951, 5, 121

(71) H.S. MAHAL et K. VENKATARAMAN, Current Sci., 1933, 2, 214

(72) V.B. MAHESH et T.R. SESHADRI, J.Chem. Soc., 1955, 2503

(73) H.S. MASON, Adv. Enzymol., 1957, 19, 134

(74) H.S. MASON et I. ONOPRYENKO, Federation Proc., 1956, 15, 310

(75) L. MASSART et R. VERCAUTEREN, Annu. Rev. Biochem., 1959, 28, 527

(76) A. MAURICE et C. MENTZER, Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 369

(77) J.A.R. MEAD, J.N. SMITH et R.T. WILLIAMS, Biochem. J., 1958, 68, 61

(78) C. MENTZER, "La théorie biogénétique et son application au classement des substances organiques d'origine végétale" Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle- Paris, Ed. Muséum, 1960

(79) J.H. MERZ et W.A. WATERS, J. Chem. Soc., 1949, 2427 et SI5

(80) H. MEYER, Monatsh. Chem., 1901, 22, 428

(81) K. MEYER, Ann. Chem., 1911, 380, 242
Ber, 1912, 45, 2846 et 2859
Ber, 1914, 47, 830

(82) E. MILLER et W.H. HARTUNG, Organic Syntheses, 13, 90

(83) D. MOLHO, Bull. Soc. chim., 1956, 39

(84) D. MOLHO, "Dégradation dans le domaine des dérivés flavoniques et corps apparentés" Colloque sur les hétérocycles oxygénés, p. 355, Lyon, Sept. 1955

(85) M. MURAKAMI et T. IRIE, Proc. Imp. Acad. Tokyo, 1935, II, 229

(86) C. NOFRE, A.CIER et A. LEFIER, Bull. Soc. chim. 1961, 530

(87) C. NOFRE, A.CIER, C. MICHOU-SAUCET et J. PARNET, C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 8II

(88) C. NOFRE, A. REVOL et A. CIER, C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 2638

(89) C. NOFRE, A. LEFIER et A. CIER, C.R. Acad. Sci., 1961, sous presse

(90) C. NOFRE, L. WELIN, J. PARNET et A. CIER, Bull. Soc. Chim. biol., 1961, sous presse

(91) N.V.NOWLAN, P.A. SLAVIN et T.S. WHEELER, J. Chem. Soc., 1950, 340

(92) T. OYAMADA, J. Chem. Soc. Japan, 1934, 55, 1256

(93) D.V. PARKE et R.T. WILLIAMS, Biochem. J., 1951, 48, 621

(94) R.W. PETERSON et J.H. WALTON, J. amer. chem. Soc., 1943, 65, 1212

(95) N. PRILESHAJEFF, Ber., 1909, 42, 4811

(96) B. et A. PULMAN, "Les théories électroniques de la Chimie Organique", Ed. Masson & Cie, 1952

(97) S. RAJAGOPOLAN et T.R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci., 1948, 27A, 85

(98) L. REICHEL et J. STEUDEL, Ann. Chem., 1942, 553, 83

(99) A. REVOL, C. NOFRE et A.CIER, C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 2486

(100) S.D. ROSS, J. amer. chem. Soc., 1946, 68, 1484

(101) T.R. SESHADRI, Tétrahédron, 1959, 6, 169

(102) T.R. SESHADRI, Annu. Rev. Biochem., 1951, 20, 487

(103) B. SKARZYNSKI, Biochem. Z., 1939, 301, 150

(104) G. STEIN et J. WEISS, Nature, 1950, 166, 1104

(105) G. STEIN et J. WEISS, J. Chem. Soc., 1949, 3245,
1951, 3265

(106) T. SWAIN, Chem. and Ind., 1954, 1480

(107) D. SWERN, Organic Reactions, 1953, 7, 378

(108) T.M. O'TOOLE et T.S. WHEELER, J. Chem. Soc., 1956, 44II

(109) S. UDENFRIEND, C.T. CLARK, J. AXELROD et B.B. BRODIE, J. Biol. Chem., 1954, 208, 731

(110) E.W. UNDERHILL, J.E. WATKIN et A.C. NEISH, Canad. J. Biochem. and Physiol., 1957, 35, 219

(111) N. URI, Chem. Revs., 1952, 50, 375

(112) V.V. VIRKAR et R.C. SHAH, J. Univ. Bombay, 1942, II, 140

(113) J.E. WATKIN, E.W. UNDERHILL et A.C. NEISH, Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 229

(114) J. WEISS, Naturwissenschaften, 1935, 23, 64

(115) J. WEISS, Nature, 1958, 181, 825

(116) J. WEISS, Experientia, 1953, 9, 61

(117) J. WEISS, Nature, 1944, 153, 748

(118) A. WEISSBERGER, J.E. LU VALLE et D.S. THOMAS, J. amer. Chem. Soc., 1943, 65, 1934

(119) T.S. WHEELER, Tetrahedron Letters, 1959, 6, 9

(120) T.S. WHEELER, Organic Syntheses, 32, 72

(121) B. WINICKI, J. CHOPIN, A. CIER et C. NOFRE, Bull. Soc. Chim. biol., 1960, 42, 1097

C.R. Acad. Sci., 1960, 251, I03

(122) B. WINICKI, A. CIER, J. CHOPIN et C. NOFRE, Bull. Soc. Chim., 1960, 1639

(123) B. WINICKI, C. NOFRE et A.CIER, Bull. Trav. Soc. pharm., Lyon, 1959, 3, 116

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

POLYMERISATIONS INDUITES PAR LES RADIATIONS IONISANTES

IMPRIME AU CENTRE DE DOCUMENTATION ET D'EQUIPEMENT PEDAGOGIQUES - 47 - 49, rue Philippe de Lassalle - LYON